

**Nachweis von *Phytophthora*-Arten in Wasser und Sediment
von Containerkulturflächen mit geschlossenem
Wasserkreislauf in niedersächsischen Baumschulen**

*Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig*

*zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)*

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von
Karin Themann
aus Vechta

1. Referent:
2. Referentin:

Prof. Dr. H.J. Aust
Prof. Dr. R. König

eingereicht am:
mündliche Prüfung (Disputation) am:

16. Juli 2001
06. November 2001

2001
(Druckjahr)

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, Herrn Prof. Dr. H.J. Aust, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

- WERRES, S., HAHN, R., & THEMANN, K. Application of different techniques to detect *Phytophthora* spp. in roots of commercial produced *Chamaecyparis lawsoniana*. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 104 (5): 474-482 (1997).
- THEMANN, K. & WERRES, S. Verwendung von Rhododendronblättern zum Nachweis von *Phytophthora*-Arten in Wurzel- und Bodenproben. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes 50 (2): 37-45 (1998).
- THEMANN, K. & WERRES, S. Guidelines for the handling of the Rhododendron leaf test to detect *Phytophthora* spp. in root, soil and water samples. INTERNET: http://www.bba.de/Phytoph/diagn_r.htm (1998).
- WERRES, S., MARWITZ, R., MAN IN'T VELD, W.A., DE COCK, A.W.A.M., BONANTS, P.J.M., DE WEERDT, M., THEMANN, K., ILIEVA, E. & BAAYEN, R.P. *Phytophthora ramorum* sp. nov., a new pathogen on *Rhododendron* and *Viburnum*. Mycological Research (im Druck) (2001).

Tagungsbeiträge

- THEMANN, K., WERRES, S. & AUST, H.J. *In vitro* Untersuchungen zum Nachweis von *Phytophthora*-Arten in Wasserproben. (Vortrag) In: 49. Deutsche Pflanzenschutztagung. Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem, Heft 301: 164. Verlag Paul Parey, Berlin (1994).
- THEMANN, K., WERRES, S. & AUST, H.J. Vorkommen von *Phytophthora* spp. im Wasserkreislauf von Containerkulturflächen in Baumschulen. (Vortrag) In: 50. Deutsche Pflanzenschutztagung. Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem, Heft 321: 552. Verlag Paul Parey, Berlin (1996).
- THEMANN, K. & WERRES, S. *In vitro* comparison of different diagnostic methods for the detection of *Phytophthora* species in water. In: Proceedings of the 9th International Congress on Soiless Culture, St. Helier, Jersey April 12-19, International Society for Soiless Culture, ISOSC, P.O. Box 52, 6700 AB Wageningen 1996: 535-550 (1997).
- THEMANN, K. & WERRES, S. Experience with different diagnostic techniques to detect *Phytophthora* species in water. (Vortrag) In: Lilja A. and Sutherlands J.R. (eds.). Proceedings of the 4th Meeting of IUFRO Working Party 7.03.04 'Diseases and Insects in Forest Nurseries'. Finnish Forest Research Institute, Research Papers 781: 83-87 (2000).

- THEMANN, K. & WERRES, S. Baiting of *Phytophthora* spp. with the Rhododendron leaf test - a guideline. (Poster) In: Hansen E.M. and Sutton W. (eds.). *Phytophthora* Diseases of Forest Trees. Proceedings of the first IUFRO Working Party 'Phytophthoras in Forest and Wildland Ecosystems', Grants Pass, Oregon USA, August 30-September 3, 1999, Forest Research Laboratory, Oregon State University, Corvallis, Oregon 97331: 141-144 (2000).
- HAHN, R., THEMANN, K. & WERRES, S. Experiences with different bait tests and serological methods to detect *Phytophthora* spp.. (Poster) In: Hansen E.M. and Sutton W. (eds.). *Phytophthora* Diseases of Forest Trees. Proceedings of the first IUFRO Working Party 'Phytophthoras in Forest and Wildland Ecosystems', Grants Pass, Oregon USA, August 30-September 3, 1999, Forest Research Laboratory, Oregon State University, Corvallis, Oregon 97331: 112-113 (2000).

Abkürzungsverzeichnis

AEE	= Azaleenerdeextrakt
<i>aqua dest.</i>	= <i>aqua destillum</i>
<i>aqua deion.</i>	= <i>aqua deionium</i>
BM	= Biomalzmedium
BMA	= Biomalz-Agar
BNRH	= Selektivmedium nach WERRES (1987)
C.	= <i>Cylindrocladium</i>
CM	= Corn-Meal-Agar
cf.	= confer
cv.	= <i>cultivar</i> = Sorte
CDA	= Czapek-Dox-Agar
CM+H	= Corn-Meal-Agar mit dem Zusatz Hymexazol
CKFL	= Containerkulturfläche
D	= Deutschland
DAS	= <i>Double Antibody Sandwich</i>
ELISA	= <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
IF	= Immunofluoreszenstest
IgG	= Immun-Gamma-Globulin
GS	= Gemüsesaft-Hafermehl-Medium
GS _{fl}	= flüssiges Gemüsesaft-Hafermehl-Medium
HM _z	= abzentrifugierter Hafermehlagar
LW	= Leitungswasser
MS	= Möhrensaftagar
min	= Minute
MSCH	= Möhrenschnitzelagar
n	= Anzahl
NFT	= <i>nutrient film technique</i>
nov.	= <i>nova</i>
NK	= Negativkontrolle
NVP	= Selektivmedium nach MCCAIN, HOLTZMANN & TRUJILLO (1967)
P.	= <i>Phytophthora</i>
PK	= Positivkontrolle
PP	= ELISA-Probenpuffer
PS	= Petrischale
Py.	= <i>Pythium</i>
PBS	= <i>phosphate buffered saline</i>
PDA	= Kartoffeldextroseagar
ppm	= <i>parts per million</i>
PARP	= Selektivmedium nach SOLEL & PINKAS (1984)
PCNB	= Pentachlornitrobenzol
PNPP	= <i>p</i> -Nitrophenylphosphat
PVAP	= Selektivmedium nach SHEPHERD & FORRESTER (1977)
RT	= Raumtemperatur
RHB	= Rhododendronblatt
<i>spp.</i>	= <i>species</i>
Std	= Stunde
TBS	= <i>tris buffered saline</i>
U/min	= Umdrehungen pro Minute
USA	= <i>United States of America</i>
V.	= <i>Verticillium</i>
v/v	= Volumen : Volumen
var.	= <i>varietas</i> = Varietät
WA	= Wasseragar
WRF	= Wasserrückführung
3-P	= Selektivmedium nach ECKERT & TSAO (1962)

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 Problemstellung	1
1.2 Zielsetzung der Arbeit	3
2 MATERIAL UND METHODEN	7
2.1 <i>Phytophthora</i> -Arten, <i>Pythium</i> -Arten und Pilze	7
2.2 Medien	7
2.2.1 Grundmedien	7
2.2.2 Selektivmedien	7
2.3 Anzucht	11
2.3.1 Kulturen auf festen Nährmedien	11
2.3.2 Kulturen in flüssigen Nährmedien	12
2.3.3 Zoosporen	12
2.4 Auswahl und Beprobung von Praxisbetrieben	15
2.4.1 Charakterisierung	19
2.4.2 Probenahme	19
2.4.3 Probenahmeorte	20
2.4.4 Probenahmeterminale	23
2.5 Nachweisverfahren	23
2.5.1 Probenmaterial, -vorbereitung und -mengen	23
2.5.2 Serologisches Verfahren DAS-ELISA (<i>Double-Antibody-Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)	26
2.5.3 Mikrobiologische Verfahren	30
2.5.3.1 Bestimmung des vegetativen Wachstums	30
2.5.3.2 Direkte Isolierung	31
2.5.4 Köderverfahren	31
2.5.4.1 Apfeltest	33
2.5.4.2 Lupinentest	34
2.5.4.3 Rhododendronblatt-Test	35
2.6 Taxonomische Untersuchungen	37
2.6.1 Herstellung von Reinkulturen	37
2.6.2 Bestimmung isolierter <i>Phytophthora</i> spp. aus Baumschulen	37
3 ERGEBNISSE	39
3.1 Nachweis von <i>Phytophthora</i> -Arten unter kontrollierten Bedingungen	39
3.1.1 Serologisches Verfahren DAS-ELISA	39
3.1.1.1 Spezifität der polyklonalen Antiseren	39
3.1.1.2 Sensitivität der polyklonalen Antiseren	43
3.1.2 Mikrobiologische Verfahren	44

<u>3.1.3 Köderverfahren</u>	46
<u>3.1.3.1 Spezifität der Köder</u>	46
<u>3.1.3.2 Sensitivität der Köder</u>	48
<u>3.2 Nachweis von <i>Phytophthora</i>-Arten unter Praxisbedingungen</u>	52
<u>3.2.1 Serologisches Verfahren DAS-ELISA</u>	52
<u>3.2.2 Mikrobiologische Verfahren</u>	54
<u>3.2.3 Köderverfahren</u>	54
<u>3.2.3.1 Apfeltest</u>	54
<u>3.2.3.2 Lupinentest</u>	55
<u>3.2.3.3 Rhododendronblatt-Test</u>	56
<u>3.2.4 Vergleich der Verfahren zum Nachweis von <i>Phytophthora</i> spp.</u>	63
<u>3.3 Epidemiologie von <i>Phytophthora</i>-Arten im Wasserkreislauf von Praxisbetrieben</u>	66
<u>3.3.1 Vorkommen von <i>Phytophthora</i> spp. in Abhängigkeit der Baumschule und des Probenahmeortes</u>	66
<u>3.3.2 Vorkommen von <i>Phytophthora</i> spp. in Abhängigkeit des Probenmaterials</u>	68
<u>3.3.3 Vorkommen von <i>Phytophthora</i> spp. in Abhängigkeit des Probenahmetermins und der Jahreszeit</u>	71
<u>4 DISKUSSION</u>	74
<u>4.1 Verfahren zum Nachweis von <i>Phytophthora</i> spp.</u>	74
<u>4.2 Epidemiologie von <i>Phytophthora</i> spp.</u>	79
<u>4.3 Schlußbetrachtung und Perspektiven</u>	84
<u>5 ZUSAMMENFASSUNG</u>	87
<u>6 LITERATUR</u>	88
<u>7 ANHANG</u>	99

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

Baumschulen sind für das Land Niedersachsen von großer wirtschaftlicher Bedeutung. 748, und damit ein Großteil von bundesweit 4085 Baumschulbetrieben, ist in diesem Bundesland angesiedelt. Den Schwerpunkt bildet das Ammerland im Regierungsbezirk Weser-Ems mit 3177 ha Freilandfläche und 58 ha Unter-Glas-Anbau, d.h. hier befinden sich etwa 70 % der Baumschulflächen Niedersachsens. Produziert werden überwiegend Nadel- und Laubgehölze, Immergrüne, Bodendecker und Solitärpflanzen. Vor allem aber werden Rhododendron und Azaleen kultiviert - etwa 4/5 des gesamten bundesdeutschen Bestandes stammen aus dem Ammerland (SEIPP 1996; STATISTISCHES BUNDESAMT 1998). Zunehmend erfolgt die Kultivierung der Pflanzen in Containern, Anzuchtgefäße mit einem Mindestgehalt von zwei Litern, als sog. Containerkultur (BÄRTELS 1995, S. 527-529). Die Container stehen auf speziellen Flächen unterschiedlicher Größe (durchschnittlich ca. 1600 m²) im Freiland. Diese Praxis hat sich in den Baumschulen aufgrund großer marktwirtschaftlicher Vorteile wie ganzjährige Handelsware und schnelle Vertriebsabwicklung etabliert (BÄRTELS 1995, S. 522; WIELAND 1996).

Da der jährliche Wasserbedarf einer Baumschule in Abhängigkeit vom Bewässerungssystem, dem Standort, der Größe und auch dem Sortiment bis zu 500.000 m³ betragen kann, spielen aufgrund des kostenintensiven Bezugs von Wasser aus kommunalen Leitungssystemen eigene Brunnen, natürliche Niederschläge, Oberflächenwasser sowie jedwede Maßnahme zur Wassereinsparung eine erhebliche Rolle (STURM 1990; LUDWIG-OHM 1996). Um den hohen Wasserverbrauch in den Betrieben möglichst gering zu halten, ging man in den letzten 20 Jahren dazu über, Containerkulturflächen mit Wasserrückführung zu installieren. Neben dem Spareffekt wird dadurch auch die Auswaschung von Nährstoffen und Pflanzenschutzmittelrückständen in den Boden unterbunden. Überschüssiges Beregnungs- und Gießwasser, sowie natürliche Niederschläge von den Containerkulturflächen werden mit Hilfe von z.B. Drainagerohren, Rinnen oder Kanälen aufgefangen und in Sammelbecken abgeführt. Meist handelt es sich dabei um Teiche, aus denen das Wasser zur erneuten Bewässerung der Pflanzen entnommen wird. Ein Wasserkreislauf entsteht (WITT 1987; RÜCKER 1989; HANSELMANN 1991; BÄRTELS 1995, S. 522-525; REUTER 1996; ULSAMER 1996). Das Wasserrecycling birgt allerdings auch die Gefahr der Entstehung phytopathogener Probleme in sich. Denn Viren, Bakterien und Pilze können mit dem zirkulierenden Wasser verbreitet werden (ATKINSON 1965; JENKINS & AVERRE 1983; PITTIS & COLHOUN 1984; THINGGAARD & MIDDELBOE 1989; ATMATJIDOU, FYNN & HOITINK 1991; BEHREND, KEMP & WOHANKA 1992; BERKELMANN, WOHANKA & KRCZAL 1994; BÜTTNER 1996; WOHANKA 1999). Vor allem die dem Leben im Wasser sehr gut angepassten *Phytophthora*-Arten, die zu den wirtschaftlich bedeutendsten Schaderregern an Baumschulgehölzen zählen (BENSON, JONES & BARKER 1982; ERWIN & RIBEIRO 1996), finden in solchen Anlagen gute Voraussetzungen für Verbreitung, Neuinfektion und Etablierung.

Über das Vorkommen von *Phytophthora*-Arten im Bewässerungswasser bundesdeutscher Baumschulen liegen bislang noch keine Informationen vor. Lediglich in Modellversuchsanlagen mit geschlossenem Wasserkreislauf konnte demonstriert werden, das ausgehend von erkrankten Pflanzen *Phytophthora* spp. verbreitet wurden und Neuinfektionen an gesunden Pflanzen auslösten (KOLB 1986; BACKHAUS, HÄRIG & HEMJOLTMANN 1990; HÄRIG & BACKHAUS 1990; WOHANKA 1990; BEHREND, KEMP & WOHANKA 1992). Außerdem wurden *Phytophthora* spp. in Oberflächen-, Fluss- und Seewasser, das zur Bewässerung von Pflanzen diente, in den USA, Kanada, Südafrika, Jordanien und Australien gefunden (KLOTZ, WONG & DEWOLFE 1959; MCINTOSH 1966; THOMSON & ALLEN 1974; WHITESIDE & OSWALT 1973; TAYLOR 1977; SHOKES & MCCARTER 1979; HALLETT & DICK 1981; VON BROEMBSSEN 1984a, 1984b; ALI-STHAYEH & MACDONALD 1991; LUTZ & MENGE 1991; MACDONALD *et al.* 1994). Nur einige dieser Untersuchungen fanden jedoch in Baumschulen mit Wasserrecycling statt (KLOTZ, WONG & DEWOLFE 1959; MCINTOSH 1966; THOMSON & ALLEN 1974; TAYLOR 1977; SHOKES & MCCARTER 1979; ALI-STHAYEH & MACDONALD 1991; ALI-STHAYEH, MACDONALD & KABASHIMA 1991; MacDonald *et al.*, 1994). In Deutschland ist bis dato sowohl unbekannt, ob, wann und wo *Phytophthora*-Arten im Recyclingwasser auftreten, als auch welches Artenspektrum unter den gegebenen klimatischen Verhältnissen und den Bedingungen der praxisüblichen Gehölzkultur möglicherweise vorkommt. Diese Daten sind jedoch zwingend nötig, um erstens Klarheit zu schaffen, ob sich in den Praxisbetrieben wirklich *Phytophthora*-Arten im geschlossenen Wasserkreislauf befinden, und damit ein Risiko der Verbreitung und Übertragung besteht und zweitens darüber nachzudenken, welche Maßnahmen sich in diesem Fall eignen, das *Phytophthora*-Risiko möglichst gering zu halten. Denn solange man sich ohne eigene Praxisuntersuchungen auf Erfahrungen aus Modellversuchen und dem Ausland mit z.T. anderen Wasserrecyclingsystemen und Bedingungen stützt, stehen die Baumschuler erwartungsgemäß Beurteilungen zum Risiko sehr skeptisch gegenüber.

Die Gattung *Phytophthora* de Bary umfasst 64 verschiedene Arten und gehört zusammen mit der Gattung *Pythium* Pringsheim zur Familie der *Pythiaceae*, Ordnung *Peronosporales*, Klasse *Oomycota*. Die *Oomycota* wurden bis vor wenigen Jahren noch zu den echten Pilzen (*regnum Fungi*) gestellt, stehen aber aufgrund neuerer molekularbiologischer Untersuchungen verwandtschaftlich den „Algen“ sehr nahe (BRASIER 1997). Systematisch werden die *Oomycota* zusammen mit den vormalig zu den Algen zählenden Klassen der *Phaeophyta*, *Xanthophyta*, *Bacillariophyta*, *Chrysophyta*, *Synurophyta* und einigen anderen noch zu definierenden Gruppen wie den „slime moulds“ in die zur Zeit noch recht heterogene Abteilung der *Chromista* oder *Stramenopiles* eingeordnet (ERWIN & RIBEIRO 1996, 1-7; SOGIN-MITCHELL & SILBERMAN 1998; COOKE *et al.* 2000).

Die meist bodenbürtigen *Phytophthora*-Arten sind fast ausnahmslos primärpathogen (TSAO 1990; ERWIN & RIBEIRO 1996, S. 1-7). Nahezu das gesamte in norddeutschen Baumschulen produzierte Pflanzensortiment, vorzugsweise Koniferen, *Rhododendron* spp. und *Calluna* spp. sind für ein oder mehrere *Phytophthora*-Arten empfindlich. Die Oomyceten verursachen vor allem Trieb-, Wurzelhals-, Wurzel- und Fruchtfäulen. Das Krankheitsbild ist durch typi-

sche Trockenheitssymptome wie Welke und das Absterben einzelner Triebe gekennzeichnet. Für die immer wieder auftretenden Schäden und Ausfälle in bundesdeutschen Baumschulen werden insbesondere die Arten *P. cinnamomi* und *P. cactorum* verantwortlich gemacht (KÜHNE 1979; BEHREND, KEMP & WOHANKA 1992; NIENHAUS & KIEWNIK 1998). Beide Arten sind für ihr weites Wirtspflanzenspektrum und ihr Vorkommen in der BRD bekannt (KRÖBER 1985). *Phytophthora*-Arten können mit Hilfe dickwandiger Oosporen oder Chlamydosporen mehrere Jahre im Boden oder im Gewebe befallener Pflanzen bei für sie ungünstigen Bedingungen, z.B. Trockenheit oder tiefe Temperaturen, überdauern. Nur in Gegenwart flüssiger Medien erfolgt die Bildung von Sporangien, aus denen die asexuellen Verbreitungsorgane, die Zoosporen, schlüpfen. Diese Zoosporen sind mit Hilfe von heterokonten Geißeln frei beweglich, werden gleichzeitig in großen Mengen freigesetzt und sind hauptverantwortlich für Neuinfektionen (TSAO 1990; MAGNANO DI SAN LIO *et al.* 1990; ERWIN & RIBEIRO 1996, S. 121-123). Wasser gilt daher als der Verbreitungsweg schlechthin für *Phytophthora*-Arten (VON BROEMBSSEN 1984b; BENSON & CAMPBELL 1985; BENSON, JONES & DAUGHTRY 1978; HOITINK & POWELL 1990). Jüngste Beispiele sind das in Europa durch *Phytophthora*-Arten verursachte Erlen- und das Eichensterben. Auch bei diesen beiden Krankheiten erfolgt die Infizierung der Bäume mit *Phytophthora* spp. über das Wasser (GIBBS 1995; JUNG, BLASCHKE & NEUMANN 1996; BRASIER, ROSE & GIBBS 1996; JUNG 1998; OLSSON 1999).

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Um *Phytophthora* spp. im Recyclingkreislauf norddeutscher Baumschulanlagen nachzuweisen und damit eine erstmalige Datengrundlage zu schaffen, werden geeignete Verfahren benötigt.

Gängige Nachweismethoden für *Phytophthora*-Arten sind:

- Mikrobiologische Verfahren, die vor allem in Verbindung mit Selektivmedien (TSAO 1970) eingesetzt werden, z.B. die *Soil Dilution Plate Method* (HENDRIX & KUHLMAN 1965; TSAO 1960; GERRETSON-CORNELL 1976), die jedoch einen erheblichen Versuchsaufwand beim Screening mit sich bringt, dem ein vergleichsweise oftmals geringer Ködererfolg gegenüber steht (DANCE, NEWHOOK & COLE 1975). So müssen beispielsweise 50 Petrischalen zur Untersuchung von nur einem Gramm Boden aufgewendet werden. Weitere Methoden sind das direkte Auslegen befallener Pflanzenteile oder das Ausplattieren (ZENTMYER 1980). In ihrer Aussage beeinträchtigt werden die Verfahren häufig durch andere bodenbürtige Organismen, die meist schneller Myzel bilden als die vergleichsweise langsam auswachsenden *Phytophthora*-Arten und somit deren Isolierung erschweren.
- Ködermethoden (*Baiting methods*) bieten sich aufgrund ihrer einfachen Handhabung und Durchführung zum Nachweis von *Phytophthora*-Arten an. Sie eignen sich häufig

gleichermaßen zum Nachweis aus Pflanzenteilen, Wasser und Boden, sind umgehend verfügbar und preiswert. Als Köder dienen Früchte (Campbell 1949, KLOTZ, WONG & DEWOLFE 1959; HENDRIX & KUHLMANN 1965a; MCINTOSH 1966; ZENTMYER 1980), Sämlinge (ZENTMYER, GILPATRICK & THORN 1960; CHEE & NEWHOOK 1965; MCINTOSH 1966; GERRETSON-CORNELL 1976; KLIEJUNAS & KO 1976; PALZER 1980; ZENTMYER 1980; DARVAS & KOTZÉ 1982) oder aber vegetative Teile von Pflanzen, wie Blätter, ausgestanzte Blattstücke, Nadeln oder abgeschnittene Wurzelstücke (GRIMM & ALEXANDER 1973; DANCE, NEWHOOK & COLE 1975; MARKS & KASSABY 1972; KLIEJUNAS & KO 1976; SHEW, BENSON & GRAND 1979; SHEW & BENSON 1982; VAN KUIK 1992; THEMANN & WERRES 1998; JUNG 1998).

Nachweismethoden jüngerer Datums sind:

- Serologische Verfahren - sie versprechen hohe Genauigkeit in der Diagnose und Testergebnisse innerhalb kurzer Zeit. Anzuführen sind die Immunofluoreszenz [IF] (GABOR *et al.* 1993; COPE & HARDHAM 1994) und der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* [ELISA] (WERRES 1987; WERRES & CASPER 1987; GABOR *et al.* 1993; GABLER 1995; OLSSON 1995; OLSSON 1999), der den Vorteil geringer Investitionskosten hat, da die ELISA Diagnostik in den Pflanzenschutzämtern routinemäßig zum Nachweis von Viren eingesetzt wird. Geräte und Laborausstattung sind daher in den meisten Fällen bereits vorhanden. Des weiteren *Immunoassay Kits*, - das sind ELISA-Tests im Schnellformat - (MACDONALD, STITES & KABASHIMA 1990; BENSON 1991; ALI-STHAYEH, MACDONALD & KABASHIMA 1991; PSCHIEDT *et al.* 1992; MACDONALD *et al.* 1994; ADGEN DIAGNOSTIC SYSTEMS 1995; CACCIOLA, PENNISI & MAGNANO DI SAN LIO 1995), der *Dot Immunobinding Assay* [Dot Blot] (HAHN & WERRES 1997) und der *Dip-Stick Immunoassay* (CAHILL & HARDHAM 1993, 1994).
- Molekularbiologische Verfahren - sie wurden bislang ausschliesslich zur Identifizierung einzelner *Phytophthora*-Arten und zur taxonomischen Neugliederung der *Phytophthora* spp. verwendet, wie die nested *Polymerase Chain Reaction* [PCR] (COOKE, WILLIAMS & DUNCAN 1996/1997; BONANTS *et al.* 1997) oder die *Random Amplified Polymorphic DNA* [RAPD] (MAN IN'T VELD *et al.* 1998).

Bei vielen dieser Methoden liegen jedoch nur *in vitro* Erfahrungen vor, so beim *Dip-Stick Immunoassay*, der auf den *in vitro* Nachweis von Zoosporen beschränkt ist. Oder die Erfahrungen für einen Praxiseinsatz fehlen, wie bei den molekularbiologischen Verfahren, oder sind unbefriedigend, wie bei den *Immunoassay Kits*. Zudem sind nur wenige Verfahren für das Untersuchungsobjekt Wasser verwendbar und ebenfalls wenige sind gleichermaßen für so komplexe Medien wie Wasser und Sediment aus Baumschulen geeignet. Deshalb wurden nur solche Verfahren ausgewählt, die im Hinblick auf das Ziel der Untersuchungen, nämlich den Nachweis verschiedener *Phytophthora*-Arten im Wasserkreislauf von Praxisanlagen norddeutscher Baumschulen vielversprechend erschienen. Denn die dargelegte

Problematik, das Untersuchungsmaterial und die nachzuweisenden Schaderreger bedingen vielfältige Anforderungen.

Dazu gehören:

- Spezifität - verwandtschaftlich nahestehende *Pythium*-Arten und andere in den bundesdeutschen Baumschulen häufig auftretende bodenbürtige Schaderreger an Gehölzen dürfen nicht erfasst werden;
- Die Detektierung eines breiten Artenspektrums, da unbekannt ist, welche Arten sich im Wasserkreislauf bundesdeutscher Baumschulen aufhalten;
- Sensitivität - auch geringe Mengen an *Phytophthora*-Organen, besonders die für die Übertragung im Wasser hauptverantwortlichen Zoosporen, müssen nachzuweisen sein;
- Unabhängigkeit des Nachweises von der Baumschule, der Jahreszeit, dem Ort der Probenahme und dem Material;
- Robustheit gegenüber dem Praxismaterial, in dem Verunreinigungen, Pflanzenreste, Dünge- oder Pflanzenschutzmittelrückstände aus der praxisüblichen Gehölzkultur enthalten sein können;
- Lieferung zuverlässiger Ergebnisse innerhalb kürzester Zeit und zu einem frühen Zeitpunkt, damit rechtzeitig entsprechende Gegenmaßnahmen eingeleitet werden können;
- Geringe Investitionskosten und gute Handhabung, so dass die Nachweismethode von Bediensteten der örtlichen Pflanzenschutzämter durchgeführt werden kann.

Zu den ausgewählten Nachweisverfahren zählen mikrobiologische Methoden, wie das Auslegen gefilterter Wasserproben auf Selektivmedien, das zum Erfolg in früheren Untersuchungen zur Pathogenübertragung innerhalb geschlossener Systeme in Modellversuchen und im Unter-Glas-Anbau führte (THOMSON & ALLEN 1974; BACKHAUS 1989; THINGGAARD & MIDDELBOE 1989; PITTIS & COLHOUN 1984; HÄRIG & BACKHAUS 1990; WOHANKA 1990), sowie Ködermethoden. Da nach ERWIN & RIBEIRO 1996 aber kein Köder geeignet ist, alle *Phytophthora*-Arten gleichermaßen gut zu erfassen, wurden verschiedene Köder ausgewählt: Der Apfeltest, bei dem es sich um eine der gängigsten Ködermethoden mit qualitativ positiven Ergebnissen zur Isolierung einer der zahlreichen *Phytophthora*-Arten aus Pflanzen, Wasser und Boden handelt (CAMPBELL 1949; PITTIS & COLHOUN 1984, JUNG 1998); der Lupinentest, der in zahlreichen Untersuchungen zur Isolierung von *P. cinnamomi*, aber auch zum Ködern anderer *Phytophthora*-Arten aus Wasser und Boden erfolgversprechend eingesetzt wurde (DANCE, NEWHOOK & COLE 1975) und der Rhododendronblatt-Test, über den bereits Kenntnisse zur Spezifität *in vitro* vorliegen (THEMANN & WERRES 1998). Als dann der DAS-ELISA mit polyklonalen Antiseren, der alle Vorteile eines serologischen Verfahrens bietet und mit dem sehr gute Erfahrungen zum Nachweis von *Phytophthora*-Arten in Praxismaterial gemacht wurden (WERRES 1987; WERRES & CASPER 1987; GABLER 1995; OLSSON 1995; OLSSON 1999). Neu ist der Nachweis in Wasser und Sedimentproben.

Die verschiedenen Methoden sollen dahingehend geprüft werden, ob sie den zuvor formulierten Anforderungen genügen. Und zwar zunächst unter kontrollierten Bedingungen im Labor und anschließend unter Praxisbedingungen in den Baumschulen. Dazu wurden vier ausgewählte ammerländer Betriebe mit Containerkulturflächen mit Wasserrückführung in regelmäßigen Abständen beprobt und die Ergebnisse zum Nachweis der Erreger miteinander verglichen. Jedes Testverfahren wird danach beurteilt, ob es überhaupt *Phytophthora*-Arten in Praxisproben nachweisen kann und was es unter Praxisbedingungen zu leisten vermag. Zu den untersuchten Einflussgrößen auf die Nachweisgüte der Methode zählten die Faktoren Alter der Baumschule, Probenahmeort, Jahreszeit und Material. Zusätzlich wurden zu einigen Probenahmeterminen Teichwasserproben auf ihren pH-Wert, Nährstoff- und Salzgehalt, sowie Pflanzenschutzmittelrückstände hin untersucht. Ziel ist die Empfehlung eines Verfahrens an die Pflanzenschutzämter zur Untersuchung von Proben im Wasserkreislauf von Baumschulen auf *Phytophthora* spp.. Des weiteren sollen erstmalig Daten zum Vorkommen von *Phytophthora*-Arten im Recyclingkreislauf norddeutscher Baumschulen ermittelt werden. Dazu gehört ob, wo, wann und welche *Phytophthora*-Arten in den Betrieben zu finden sind, damit die Epidemiologie der Arten in den Baumschulen unter den gegebenen Bedingungen und klimatischen Verhältnissen besser verstanden wird und geeignete Bekämpfungsstrategien, insbesondere Präventivmaßnahmen, entwickelt werden können.

2 Material und Methoden

2.1 *Phytophthora*-Arten, *Pythium*-Arten und Pilze

Für die Untersuchungen wurden *Phytophthora*-Arten aus nahezu allen WATERHOUSE-Gruppen (STAMPS *et al.* 1990) ausgewählt, und zwar bevorzugt diejenigen Isolate, die von erkrankten Baumschulkulturen stammten (Tab. 1). Des weiteren wurden *Pythium*-Arten und -Isolate, sowie zwei *Verticillium*-Arten und eine *Cylindrocladium*-Art verwendet, die vorwiegend aus Baumschulgehölzen isoliert worden waren (Tab. 1).

2.2 Medien

Ausgewählt wurden Medien, die sich aufgrund langjähriger Erfahrungen als sehr gut geeignet für Untersuchungen an und mit *Phytophthora*-, *Pythium*- oder anderen Pilzarten erwiesen hatten (Tab. 2). Verwendet wurden feste und flüssige Medien zur Anzucht der pilzähnlichen Mikroorganismen und Pilze, zur Erzeugung bestimmter Organe, z.B. Strukturen auf festen Nährmedien und Zoosporen, sowie zum Wachstumsvergleich verschiedener ausgewählter *Phytophthora*-Arten und zur Artbestimmung aus Praxisproben isolierter *Phytophthora* spp.

2.2.1 Grundmedien

Sofern nicht anders angegeben wurden alle Medien für 25 min bei 121 °C autoklaviert, die Mengenangaben beziehen sich auf 1000 ml *aqua dest.*

2.2.2 Selektivmedien

Es wurden aus der Literatur Medien ausgewählt, die als besonders geeignet zur Isolierung eines breiten Spektrums von *Phytophthora*-Arten insbesondere aus Boden- und Pflanzenproben beschrieben worden sind. Den angegebenen Quellen zufolge sollten diese Medien unerwünschte Begleitorganismen unterdrücken, *Phytophthora*-Arten aber unverändert aus Proben auswachsen lassen (Tab. 3). Alle verwendeten Selektivmedien basierten entweder auf Corn-Meal-Agar (CM) oder Gemüsesaft-Hafermehl-Agar (GS) als Grundmedium (siehe 2.2.1), dazu kamen ein oder mehrere Zusätze. Die Fungizide und Antibiotika wurden jeweils getrennt in sterilem *aqua dest.* gelöst und dem auf ca. + 40 °C abgekühlten Grundmedium zugegeben. Der pH-Wert des Mediums wurde vor dem Autoklavieren (121 °C, 25 min) auf 5,0 – 6,0 eingestellt. Alle Mengenangaben beziehen sich auf 1000 ml *aqua dest.*

Tabelle 1: *Phytophthora*-Arten, *Pythium*-Arten und Pilze

Gattung	Art	WH-Gruppe ¹⁾	Isolatnr.	Wirt/Material	Herkunft ²⁾
<i>Phytophthora</i>					
	<i>cactorum</i>	I	9/88/92	<i>Rhododendron</i> spec.	D
	<i>nicotianae</i>	II	1705	<i>Spatiphyllum</i> spec.	D
	<i>palmivora</i>	II	1	<i>Hedera helix</i>	D
	<i>citricola</i>	III	1490	<i>Rhododendron simsii</i>	D
	<i>fragariae</i> var. <i>fragariae</i>	V	L1	<i>Fragaria x ananassa</i>	D
	<i>megasperma</i>	V	2	<i>Asparagus officinalis</i>	D
	<i>cambivora</i>	VI	6360	<i>Malus</i> spec.	D
	<i>cinnamomi</i> (A ₂)	VI	8/88/92	<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>	D
	<i>cinnamomi</i> (A ₁)	VI	69094	unbekannt	D
	<i>cryptogea</i> (A ₂)	VI	1810	<i>Prunus avium</i>	USA
	<i>drechsleri</i> (steril)	VI	1813	<i>Prunus avium</i>	USA
	<i>erythroseptica</i>	VI	6402	<i>Rubus idaeus</i>	D
	<i>gonapodyides</i>	VI	6989	Wasser	USA
	cf. <i>gonapodyides</i>	VI	62689	unbekannt	D
	<i>richardiae</i>	VI	3876	<i>Zantedeschia</i> spec.	USA
	<i>vignae</i>	VI	3017	<i>Vigna unguiculata</i>	USA
<i>Pythium</i>					
	<i>anandrum</i>		1731	<i>Erica gracilis</i>	D
	<i>ultimum</i>		1497	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	D
	<i>prolatum</i>		16/92-9	<i>Rhododendron simsii</i>	D
	<i>sylvaticum</i>		P 1/92	<i>Microbiota decussata</i>	D
	<i>intermedium</i>		P 6/92	<i>Cytisus</i> spec.	D
<i>Verticillium</i>					
	<i>albo-atrum</i>		V 209	<i>Medicago sativa</i>	D
	<i>dahliae</i>		V 208	<i>Acer campestre</i>	D
<i>Cylindrocladium</i>					
	<i>scoparium</i>		1553	<i>Erica gracilis</i>	D

¹⁾ WH = Einteilung der *Phytophthora*-Arten nach STAMPS *et al.* 1990

²⁾ Die Isolate aus den USA wurden von Dr. Helga Förster, University of California, Riverside, California 92521 zur Verfügung gestellt.

A₁, A₂ = mating type

Tabelle 2: Verwendete Grundmedien und Verwendung in den Untersuchungen

Medium (Abkürzung)	Medienbestandteile und pH-Wert	Verwendung	
		Zustand	Zweck
Abzentrifugierter Hafermehl-Agar¹⁾ (HM_z)	30 g Hafermehl (HOLO [®] Hafergold Neuform [®]) 15 g Agar-Agar (DIFCO Nr. 0140-01) pH 7,0	fest	Anzucht von <i>Phytophthora</i> und <i>Pythium</i> spp.
Potatoo-Dextrose-Agar (PDA)	39 g PDA (DIFCO Nr. 0013-17-6) pH 5,4	fest	Anzucht von <i>Verticillium</i> spp. und <i>Cylindrocleftium scoparium</i>
Corn Meal-Agar (CM)	17 g Corn Meal Agar (OXOID Nr. 936429) pH 6,0	fest	Vergleich des vegetativen Wachstums (siehe 2.5.3.1) auf verschiedenen Medien
Möhrensaft-Agar (MS)	50 ml Möhrensaft (EDEN Neuform [®]) 15 g Agar-Agar (DIFCO Nr. 0140-01) 950 ml <i>aqua dest.</i> pH 5,5	fest	Vergleich des vegetativen Wachstums (siehe 2.5.3.1) auf verschiedenen Medien
Möhrenschnitzel-Agar (MSCH)	50 g Möhrenschnitzel 15 g Agar-Agar (DIFCO Nr. 0140-01) pH 6,4	fest	Anzucht von <i>Phytophthora</i> und <i>Pythium</i> spp. Auslegen von Köderpflanzen (siehe 2.5.4) Mikrobiologische Untersuchungen (siehe 2.5.3) Taxonomische Untersuchungen (siehe 2.6)
Gemüsesaft- Hafermehl-Medium¹⁾ (GS bzw. GS_{fl})	15 g Hafermehl (HOLO [®] Hafergold Neuform [®]) 100 ml Rabenhorster [®] Gemüsesaft ohne Salzzusatz 2 g CaCO ₃ (MERCK Nr. 2063) 15 g Agar-Agar ²⁾ (DIFCO Nr. 0140-01) pH 6,8	fest flüssig	Vergleich und Bestimmung des vegetativen Wachstums (siehe 2.5.3.1) auf verschiedenen Medien Anzucht von <i>Phytophthora</i> und <i>Pythium</i> spp.

Fortsetzung Tabelle 2

Medium (Abkürzung)	Medienbestandteile und pH-Wert	Verwendung	
		Zustand	Zweck
Biomalz-Medium (BMA bzw. BM)	40 g Biomalzextrakt (MERCK Nr. 036 V 854791)	fest	Anzucht von <i>Verticillium</i> spp.
	15 g Agar-Agar ²⁾ (DIFCO Nr. 0140-01) pH 7,0	flüssig	Anzucht von <i>Cylindrocladium scoparium</i>
Czapek-Dox-Medium (CDM)	33,4 g Czapek-Dox (DIFCO Nr. 0338-01-2) 1,5 g Hefeextrakt (DIFCO Nr. 0127-17-4) pH 7,4	flüssig	Anzucht von <i>Verticillium</i> spp.
Verdünnter Gemüsesaft (verd. GS)	2 ml Rabenhorster® Gemüsesaft ohne Salzzusatz 98 ml <i>aqua dest.</i>	flüssig	Sporangien-/Zoosporeninduktion
Azaleenerdeextrakt ³⁾ (AEE)	100 ml (v) Azaleenerde pH 4,3 (4 :1 feiner Torf ⁴⁾ / Perlite® (v/v) plus 1,2 g CaCO ₃ [MERCK Nr. 2063] pro Liter Torf) 100 ml <i>aqua dest.</i>	flüssig	Sporangien-/Zoosporeninduktion Taxonomische Untersuchungen (siehe 2.6)
Wasseragar (WA)	20 g Agar-Agar (DIFCO Nr. 0140-01) pH 7,0	fest	Taxonomische Untersuchungen (siehe 2.6)

¹⁾ Das Hafermehl wurde zunächst mit der halben Menge *aqua dest.* aufgekocht, anschließend das restliche Wasser zugegeben, um dann eine Stunde aufzuquellen. Danach erfolgte ein zehninütiges Abzentrifugieren bei 3500 U/min (1260 g*). Der Überstand wurde abgemessen und je nach Medium mit den entsprechenden Mengen Gemüsesaft, Kalziumcarbonat und Agar-Agar versetzt.

²⁾ Zugabe nur bei festen Medien GS und BMA (fest).

³⁾ Der Extrakt wurde unsteril verwendet. Azaleenerde und Wasser wurden miteinander vermengt, 30 min bei RT (+ 18 – 22 °C) stehen gelassen und anschließend mit einem groben Faltenfilter (SCHLEICHER & SCHUELL Nr. 595 ½) filtriert.

⁴⁾ Sphagnum-Torf; Klasmann-Deilmann Vertriebsgesellschaft Deutschland GmbH, Georg Klasmann Str. 2-10, 49744 Geeste

Tabelle 3 : Selektivmedien

Abkürzung	Grundmedium	Zusatz	Menge	Literatur
CM+H	CM	Hymexazol ¹⁾	50 mg	
3-P	CM	Pimaricin (MERCK Nr. 7360) Polymyxin (SIGMA Nr. P-1004) Penicillin (SIGMA Nr. P-5250)	100 ppm 10 ppm 10 ppm	ECKERT & TSAO 1962
PARP	CM	Pimaricin (MERCK Nr. 7360) Ampicillin (SIGMA Nr. A-9393) Rifampicin (SIGMA Nr. R-3501) Pentachlornitrobenzol (SIGMA Nr. P-3395) Hymexazol ¹⁾	10 mg 125 mg 10 mg 100 mg 50 mg	modifiziert nach SOLEL & PINKAS 1984
PVAP	GS	Pimaricin (MERCK Nr. 7360) Vancomycin (SIGMA Nr. V-2002) Ampicillin (SIGMA Nr. A-9393) Pentachlornitrobenzol (SIGMA Nr. P-3395)	20 mg 75 mg 150 mg 50 mg	modifiziert nach SHEPHERD & FORRESTER 1977
NVP	GS	Nystatin (SIGMA Nr. N-3503) Vancomycin (SIGMA Nr. V-2002) Pentachlornitrobenzol (SIGMA Nr. P-3395)	50 ppm 100 ppm 10 ppm	modifiziert nach MCCAIN, HOLTZMANN & TRUJILLO 1967
BNRH	GS	Benomyl ²⁾ Nystatin (SIGMA Nr. N-3503) Rifamycin (SIGMA Nr. R-8626) Hymexazol ¹⁾	10 mg 10 mg 30 mg 50 mg	WERRES 1987

¹⁾ Tachigaren®, Sumitomo Shoji Deutschland GmbH, Georg-Glock-Str. 14, D-40474 Düsseldorf

²⁾ Du Pont Benomyl; 31726-00/DuPont de Nemours (Deutschland) GmbH, Du Pont Str. 1, D-61343 Bad Homburg

2.3 Anzucht

2.3.1 Kulturen auf festen Nährmedien

In allen Untersuchungen wurden Kulturen auf festen Medien benötigt. Die pilzähnlichen Mikroorganismen und Pilze wurden auf je 15 ml des jeweiligen festen Mediums (siehe 2.2.1) pro Petrischale (Ø 9 cm) bei + 20 °C im Dunkeln kultiviert, bis die Platte vollständig bewachsen war.

2.3.2 Kulturen in flüssigen Nährmedien

Für das serologische Verfahren (siehe 2.5.2) wurden Flüssigkulturen eingesetzt. Die Anzucht erfolgte für die *Phytophthora*- und *Pythium*-Isolate in GS_{fl}, für die *Verticillium*-Isolate in CDM (siehe 2.2.1). Das *Cylindrocladium*-Isolat wurde in BM angezogen. Alle Isolate wurden in Erlenmeyerkolben mit je 100 ml des sterilen Mediums angeimpft, und zwar zehn Myzelplättchen (Ø 1 cm) pro Isolat, und bei + 20 °C im Dunkeln bis zum jeweiligen Optimalzeitpunkt der Ernte (Ende des linearen Myzelwachstums) inkubiert. Dieser Zeitraum betrug bei den *Phytophthora*- und *Pythium*-Isolaten zwischen 5 und 14 Tagen, beim *Cylindrocladium*-Isolat 8 Tage und bei den *Verticillium*-Isolaten 28 Tage.

Alle Kulturen auf festen und in flüssigen Nährmedien wurden vor ihrer Verwendung mikroskopisch auf das Vorhandensein von Myzel und gegebenenfalls Organen hin untersucht (Tab. 4).

2.3.3 Zoosporen

Für die Induzierung einer optimalen und möglichst großen Anzahl von Sporangien und Zoosporen in den Untersuchungen unter kontrollierten Bedingungen wurden in Abhängigkeit der *Phytophthora*-Art verschiedene Medien und Verfahren verwendet. Es wurden dazu diejenigen Arten ausgewählt, die nach Aussage des Pflanzenschutzdienstes besonders häufig aus Baumschulgehölzen isoliert werden.

Des weiteren wurden die beschriebenen Verfahren bei den Untersuchungen zur Bestimmung isolierter *Phytophthora*-Arten aus Praxisproben eingesetzt (siehe 2.6).

A) Isolat *P. cactorum* 9/88/92

Das Isolat wurde auf HM_z (siehe 2.2.1) angeimpft und für 14 Tage bei + 20 °C dunkel, inkubiert. Anschließend wurden vom Rand der bewachsenen Petrischalen jeweils zehn Myzelplättchen (Ø 1 cm) mit einem Korkbohrer ausgestanzt und in 100 ml des verdünnten sterilen Gemüsesaftes in Erlenmeyerkolben gegeben. Die Kolben wurden für 14 Tage auf einem Schüttler (50 U/min), dunkel, geschwenkt. Danach wurde der Gemüsesaft gegen steriles *aqua dest.* ausgetauscht.

Zur Entlassung der Zoosporen aus den gebildeten Sporangien wurden die Kolben dann für 30 min im Kühlschrank (+ 8 °C) und anschließend bei Raumtemperatur (+ 18-22 °C) etwa 30 min inkubiert. Mit Hilfe eines Haushaltssiebs wurden die Myzelplättchen aus der Zoosporensuspension entfernt und die Anzahl Zoosporen pro ml Lösung mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer mikroskopisch bestimmt. Die jeweiligen Verdünnungen wurden mit sterilem *aqua dest.* hergestellt.

B) Isolat *P. cinnamomi* 8/88/92

Das Isolat wurde auf MSCH (siehe 2.2.1) (mindestens 20 ml pro Petrischale, Ø 9 cm) angeimpft und für 14 Tage bei + 20 °C, dunkel, inkubiert. Anschließend wurde das auf der Agaroberfläche gebildete Luftmyzel von je einer Platte mit Hilfe zweier Pinzetten vorsichtig abgelöst und als zusammenhängende Myzeldecke in eine Petrischale (Ø 9 cm) mit 20 ml AEE (siehe 2.2.1) übertragen. Die Platten wurden für vier Tage bei + 23/25 °C, Tag/Nacht-Rhythmus (12 Std Licht / 12 Std Dunkelheit) in einem Klimaschrank inkubiert.

Die Entlassung der Zoosporen erfolgte analog der für *P. cactorum* 9/88/92 beschriebenen Methode, allerdings benötigten die Zoosporen des Isolats zum Schlüpfen mindestens 45 bis 60 min.

C) Isolate *P. citricola* 1490, *P. cryptogea* 1810, *P. drechsleri* 1813

Die Isolate wurden auf MSCH (siehe 2.2.1) angeimpft und für 14 Tage bei + 20 °C, dunkel, inkubiert. Anschließend wurden vom Rand der bewachsenen Petrischalen jeweils sieben bis zehn Myzelplättchen (Ø 2 cm) mit einem Korkbohrer ausgestanzt und in Petrischalen (Ø 9 cm) gelegt, in denen sie dann mit etwa 15-20 ml der jeweiligen Induktionsflüssigkeit überschichtet wurden, so dass die Plättchen gerade von der Lösung bedeckt wurden. Die Isolate *P. citricola* 1490 und *P. cryptogea* 1810 wurden in AEE (siehe 2.2.1) drei Tage bei + 23/25 °C Tag/Nacht-Rhythmus (12 Std Licht / 12 Std Dunkelheit) und das Isolat *P. drechsleri* 1813 in sterilem *aqua dest.* vier Tage bei + 28 °C, dunkel, inkubiert.

Die Entlassung der Zoosporen erfolgte analog der für *P. cactorum* 9/88/92 beschriebenen Methode.

Tabelle 4: Strukturen pilzähnlicher Mikroorganismen und Pilze auf festen und in flüssigen Nährmedien

Isolat	Strukturen	
	auf festem Nährmedium (HM _Z bzw. MSCH für <i>Phytophthora</i> [P.] und <i>Pythium</i> [Py.] spp. BMA für <i>Verticillium</i> spp. PDA für <i>Cylindrocladium scoparium</i>) ¹⁾	in flüssigem Nährmedium (GS _{fl} für <i>Phytophthora</i> [P.] und <i>Pythium</i> [Py.] spp. CDM für <i>Verticillium</i> spp. BM für <i>Cylindrocladium scoparium</i>) ¹⁾
<i>P. cactorum</i> 9/88/92	Myzel, Oosporen	Myzel, Oosporen
<i>P. cambivora</i> 6360	Myzel / Hyphenschwellungen	Myzel
<i>P. cinnamomi</i> 8/88/92	Myzel / Hyphenschwellungen, beginnende Chlamydosporenausbildung	Myzel / Hyphenschwellungen, beginnende Chlamydosporenausbildung
<i>P. citricola</i> 1490	Myzel, Hyphenschwellungen, Oogonien/Oosporen	Myzel
<i>P. cryptogea</i> 1810	Myzel	Myzel
<i>P. drechsleri</i> 1813	Myzel	Myzel
<i>P. erythroseptica</i> 6402	Myzel, Chlamydosporen	Myzel
<i>P. fragariae</i> var. <i>fragariae</i> L1	Myzel	Myzel
<i>P. gonapodyides</i> 6989	Myzel	Myzel
Cf. <i>P. gonapodyides</i> 62689	Myzel, Sporangien	Myzel
<i>P. megasperma</i> 2	Myzel, Oosporen	Myzel
<i>P. nicotianae</i> 1705	Myzel	Myzel
<i>P. palmivora</i> 1	Myzel, Chlamydosporen, Sporangien	Myzel, Chlamydosporen, Sporangien
<i>P. richardiae</i> 3876	Myzel, Oogonien/Oosporen	Myzel
<i>P. vignae</i> 3017	Myzel, Oogonien/Oosporen	Myzel
<i>Py. anandrum</i> 1731	Myzel, Oogonien/Oosporen	Myzel
<i>Py. ultimum</i> 1497	Myzel Oogonien/Oosporen	Myzel, Sporangien, Oogonien/Oosporen
<i>Py. prolatum</i> 16/92-9	Myzel	Myzel
<i>Py. Sylvaticum</i> P 1/92	Myzel, Sporangien	Myzel, Sporangien
<i>Py. Intermedium</i> P 6/92	Myzel, Sporangien	Myzel, Sporangien
<i>V. albo-atrum</i> V 209	Myzel, Konidien	Myzel, Konidien
<i>V. dahliae</i> V 208	Myzel	Myzel
<i>C. scoparium</i> 1553	Myzel, Konidien	Myzel, Konidien

¹⁾ HM_Z = Hafermehlagar, MSCH = Möhrenschnitzelagar, BMA bzw. BM = Biomalz-Medium, PDA = Potatoe-Dextrose-Agar, GS_{fl} = Gemüsesaft-Hafermehl-Medium, CDM = Czapek-Dox-Medium (siehe 2.2.1, Tab.2)

2.4 Auswahl und Beprobung von Praxisbetrieben

Für die Probenahmen wurde das Ammerland in der Region Weser-Ems ausgewählt (Abb. 1):

Hier liegen etwa 70 % der Baumschulflächen des Landes Niedersachsen. Allein der Landkreis Ammerland besitzt etwa 2100 ha Flächen für die Produktion von Gehölzen, darunter vorwiegend solche, die auch Wirtspflanzen von *Phytophthora*-Arten sind, wie z.B. *Rhododendron* spp., *Chamaecyparis* spp., *Taxus* spp. oder *Calluna* spp. kultiviert. In dieser Region finden sich zahlreiche Betriebe, die Containerkulturflächen mit Wasserrückführung besitzen (SEIPP 1996, STATISTISCHES BUNDESAMT 1998).

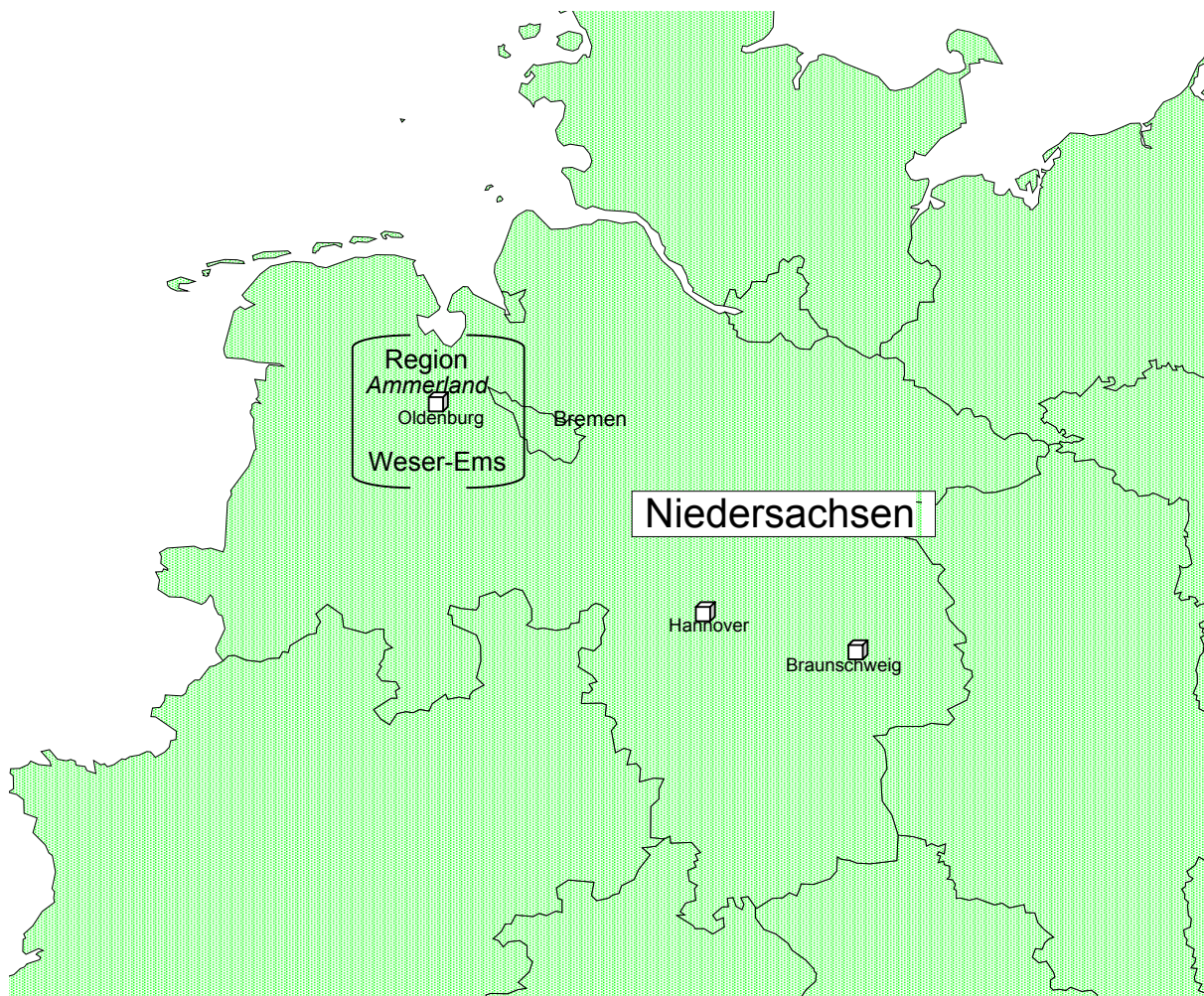


Abb. 1: Niedersachsen mit Region Weser-Ems/Ammerland

Containerkulturflächen mit Wasserrückführung sind grundsätzlich durch folgende Merkmale gekennzeichnet (Abb. 2):

Die Kulturflächen der Container befinden sich im Freiland. Zur besseren Standfestigkeit, aber auch um das Auswurzeln der Pflanzen, Unkrautbewuchs, Veralgung und Verschmutzung der Standflächen zu verhindern, stehen die Container auf einem schwarzen Bänd-

chengewebe aus Polypropylen (sog. "MYPex-Matte"). Unter den Kulturflächen befindet sich eine plane Sand- oder Kiesschicht; die Kulturflächen sind zum Untergrund hin mit einer undurchlässigen Folie abgedichtet. Zur raschen Entwässerung weisen die Flächen ein Gefälle von meist 2 % auf (Abb. 3).

Das überschüssige Gießwasser, Drainwasser und natürliche Niederschläge fließen über oberirdisch oder unterirdisch verlegte Kanäle, Rinnen oder Rohre von den Kulturflächen ab. Zum Teil gelangt das Wasser einzelner oder mehrerer Kulturflächen zunächst in sog. Ablaufschächte, von wo es unterirdisch weiter in Richtung Sammelbecken fließt (Abb. 4).

Das Wasser gelangt in ein zentrales Sammelbecken, meistens handelt es sich dabei um Teiche natürlichen oder künstlichen Ursprungs (Abb. 5, 7). In den alteingesessenen Betrieben wurden bereits vorhandene Naturteiche genutzt, die früher ausschließlich und auch heute noch, sofern nicht gesonderte Becken zur Verfügung stehen, der Frostschutzberegnung dienen. Neu angelegte künstliche Teiche hingegen werden heute gezielt auf die Bedürfnisse

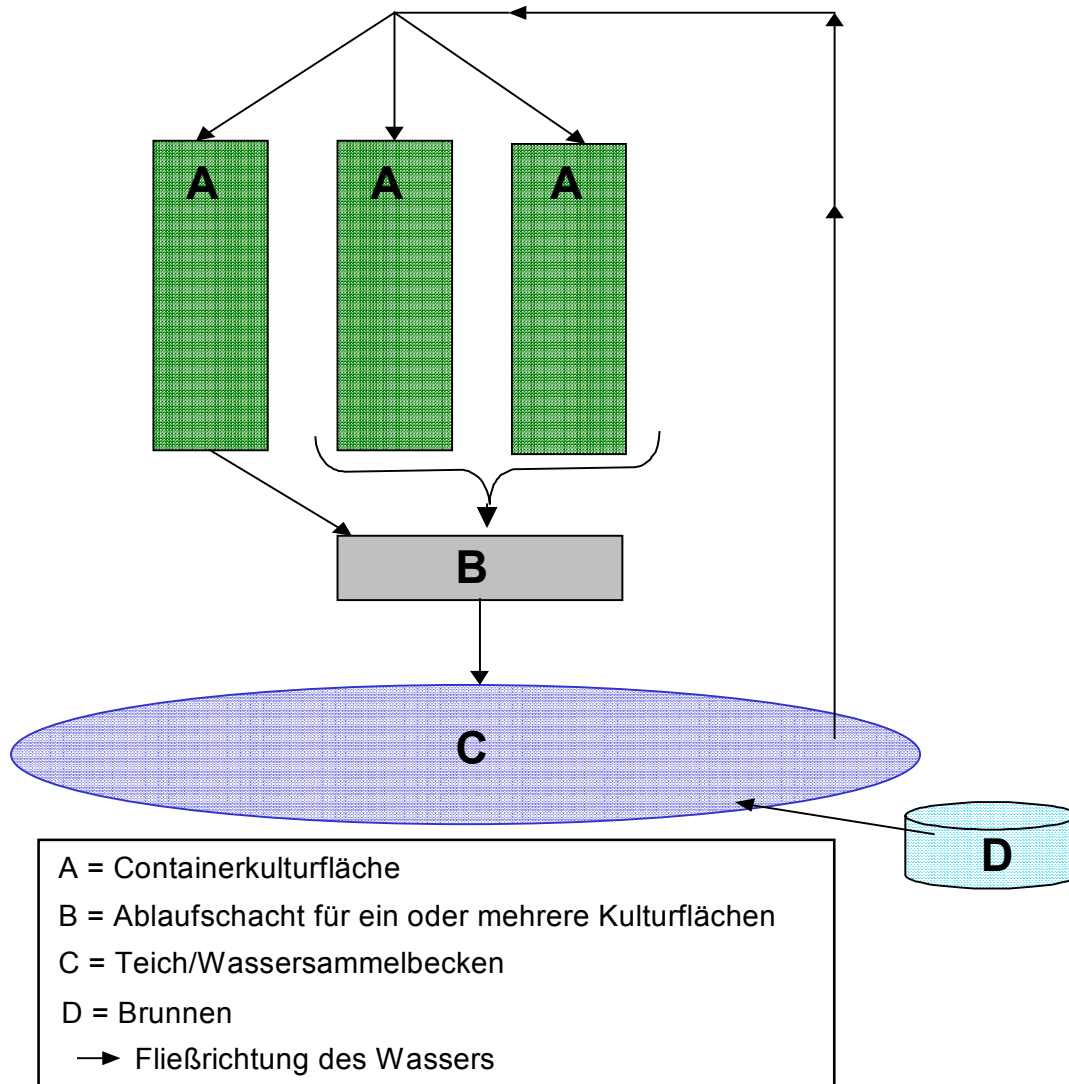


Abb. 2: Allgemeines Aufbauschema von Containerkulturflächen mit Wasserrückführung

des Wasserrecyclings hin zugeschnitten. Sie sind mit einer speziellen wasserundurchlässigen Folie komplett ausgekleidet, die eine Versickerung in den Untergrund verhindert. Eine Baugenehmigung für die Sammelbecken ist – im Gegensatz zu den Containerkulturflächen – zwingend vorgeschrieben. Messungen ergaben, dass durchschnittlich etwa 35 % des Gießwassers als Überschuss in den Hauptwasserspeicher zurückgelangen (HANSELMANN 1991).

Neben dem zurückfließenden Wasser gelangen aufgefangene natürliche Niederschläge, Oberflächen- und Brunnenwasser, das bei Bedarf eingeleitet wird, in die Teiche (Abb. 6). Mittels Pumpen wird das Wasser zur erneuten Bewässerung der Pflanzen aus den Teichen entnommen.



Abb. 3: Containerkulturfläche mit Wasserrückführung

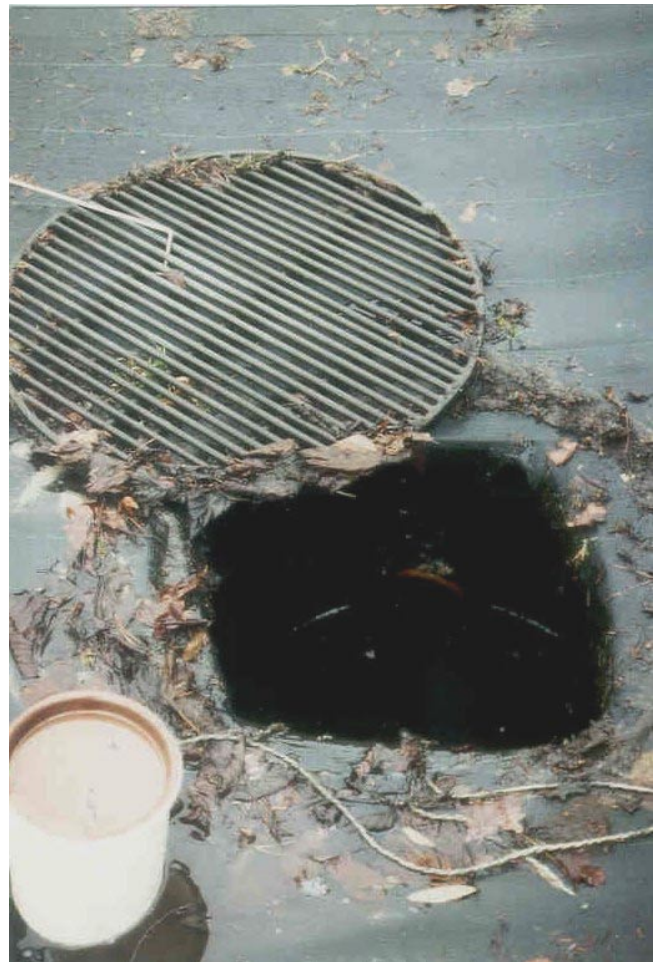


Abb. 4: Ablauf einer Containerkulturfläche



Abb. 5: Bewässerungsteich in Betrieb Nr. 1 (siehe 2.4.1)



Abb. 6: Einleitung von Brunnenwasser in Betrieb Nr. 4 (siehe 2.4.1)



Abb. 7: Bewässerungsteich in Betrieb Nr. 4 (siehe 2.4.1)

2.4.1 Charakterisierung

Bei der Auswahl der ammerländer Baumschulen für die Praxisuntersuchungen wurde nach folgenden Kriterien vorgegangen:

- Es sollte sich um für die Region typische Betriebe handeln.
- Die Betriebe sollten möglichst unterschiedlich sein.
- Es sollten Betriebe unterschiedlichen Alters vertreten sein.
- Das in den Betrieben kultivierte Pflanzenspektrum sollte vorwiegend aus für *Phytophthora*-Arten empfindlichen Wirtspflanzen bestehen.
- Es sollten Betriebe mit und ohne Problemen mit *Phytophthora* spp. in den Beständen darunter sein.

Alle vier ausgewählten Baumschulen verfügten über Containerkulturf lächen mit Wasser-rückführung, sie unterschieden sich in Alter, Größe und Aufbau der Recyclingsysteme und verfügten über einen betriebseigenen Brunnen, von dem aus bei Bedarf Wasser in den Teich eingespeist werden konnte (Tab. 5).

2.4.2 Probenahme

Die Beprobung der Baumschulen erfolgte in Zusammenarbeit mit der Gartenbauabteilung der Landwirtschaftskammer Weser-Ems, Mars-la-Tour-Str. 1-13, D-26121 Oldenburg.

Bei den Teichen erfolgte die Entnahme der Wasserproben mit Hilfe eines zwei-Liter-Schöpfgefäßes aus Kunststoff, welches an einem etwa 2,5 m langem Bambusrohr befestigt war. Für die Sedimentproben wurde das Kunststoffgefäß gegen ein ein-Liter-Blechgefäß mit wasser-durchlässigem Boden ausgetauscht. An unterschiedlichen Stellen von der Uferzone aus wurden jeweils mehrere Wasserproben unterhalb der Wasseroberfläche und Sedimentproben vom Teichgrund entnommen (Abb. 8).

Die Entnahme von Brunnenwasser erfolgte mit Hilfe elektrisch betriebener Förderpumpen. Direkt an der Einleitungsstelle in den Teich – meist ein Metall- oder Kunststoffrohr – wurde das Wasser mit dem Schöpfgefäß aufgefangen. Genauso wurde bei der Entnahme der Wasserproben aus dem zentralen Ablaufschacht in Baumschule Nr. 1 (siehe 2.4.3) verfahren. Für die Sedimentproben aus den oberirdischen Abläufen wurde an unterschiedlichen Stellen Material mit einer Gartenschaufel entnommen.

Sämtliche Proben wurden in lichtundurchlässige drei-Liter-Kunststoffbehälter mit Deckel gefüllt. Die Probenahmegeräte wurden nach jedem Gebrauch gesäubert und mit 70 %igem Ethanol desinfiziert.



Abb. 8: Probenentnahme an einem der Teiche

2.4.3 Probenahmeorte

Die Probenahmeorte richteten sich in den Betrieben nach den jeweiligen Entnahmemöglichkeiten von Wasser- und Sediment (Tab. 6). So war z.B. im Teich der Baumschule Nr. 1 noch kein Sediment vorhanden und da die Kulturflächen über ein komplett unterirdisch verlegtes Drainagerohrsystem entwässert wurden, bot sich außer dem zentralen Sammelschacht hier keine weitere Möglichkeit der Probenahme des überschüssigen Gießwassers. Des weiteren konnten zum Termin Anfang Februar nicht an allen Orten Proben genommen werden, da die Pumpen, die das Wasser aus den Brunnen bzw. aus den zentralen Ablaufschächten in den Teich fördern, im Winter abgeschaltet sind.

Tabelle 5: Merkmale der für die Praxisuntersuchungen ausgewählten ammerländer Baumschulen

Betriebliche Daten	Nr. 1	Praxisbetrieb		Nr. 4
		Nr. 2	Nr. 3	
Baujahr der Baumschule	1992	ca. 1972	ca. 1972	ca. 1970/71
Alter des/r Teich/e (Jahre)	3	>20	>20 ³⁾	>20
Alter der CKFL mit WRF ¹⁾ (Jahre)	3	3-12	8-10	2-7
Anbaufläche insgesamt (ha)	18	30	15	2
CKFL mit WRF ¹⁾ (ha)	3,5	8	15	1,6
Wasserversorgung der CKFL mit WRF ¹⁾	80 % Gießwagen 20 % Tröpfchenbewässerung	100 % Kreisregner ²⁾	100 % Kreisregner ²⁾	95 % Kreisregner ²⁾ 5 % Tröpfchenbewässerung
Teichgröße (m ³)	6000	1000	2500 ³⁾	1000
Besonderheiten	Zentrale Entwässerung über komplett unterirdisch verlegtes Drainagerohrsystem; Teich vollständig mit extrem dicker Folie ausgekleidet und ohne Sediment; Probleme mit <i>Phytophthora</i> spp. ⁴⁾ nicht bekannt;	Zunächst oberirdische Entwässerung über Betonrinnen, weiterer Verlauf über unterirdisches Rohrsystem; Teich mit starkem Uferbewuchs; seit Jahren Probleme mit <i>Phytophthora</i> spp. ⁴⁾ insbesondere an <i>Chamaecyparis</i> spp.;	Entwässerung über Ablaufschrächte, die sich auf den einzelnen Kulturfächen befinden und von dort aus über ein unterirdisch verlegtes Drainagerohrsystem; zwei Teiche die miteinander durch Rohre verbunden sind; Probleme mit <i>Phytophthora</i> spp. ⁴⁾ nicht bekannt;	Entwässerung über unterirdisch verlegtes Drainagerohrsystem, mit mehreren zentralen Ablaufschrächten; Probleme mit <i>Phytophthora</i> spp. ⁴⁾ an <i>Chamaecyparis obtusa</i> in den Jahren 1994 und 1995;

¹⁾ Containerkulturfächen mit Wasserrückführung²⁾ Überkronenbewässerung³⁾ zwei Teiche gleicher Größe und gleichen Alters⁴⁾ Aussagen der jeweiligen Betriebsleiter

Tabelle 6 : Probenahmeorte und -material aus den Praxisbetrieben

Betrieb	Ort der Probennahme (Kürzel)	Material (Kürzel)	Abkürzung
1	a direkt aus dem zentralen Sammelschacht des rücklaufenden Wassers aller Kulturflächen (A)	Wasser (W)	1a AW
	b wie a, nur direkt vor Einleitung in den Teich (A)	Wasser (W)	1b AW
	Teich (T)	Wasser (W)	1 TW
	Brunnen (B)	Wasser (W)	1 BW
2	a Ablauf (oberirdisch) an einer Kulturfläche (<i>Chamaecyparis lawsoniana</i> 'Columnaris') mit makroskopisch sichtbaren Symptomen von <i>Phytophthora</i> spp. ¹⁾ (A)	Sediment (S)	2a AS
	b wie a , nur <i>Chamaecyparis lawsoniana</i> 'Columnaris' Jungpflanzen mit makroskopisch sichtbaren Symptomen von <i>Phytophthora</i> spp. ¹⁾ (A)	Sediment (S)	2b AS
	Teich (T)	Wasser (W)	2 TW
	Teich (T)	Sediment (S)	2 TS
	Brunnen (B)	Wasser (W)	2 BW
3	a Ablaufschacht (unterirdisch) einer Kulturfläche (<i>Chamaecyparis</i> spec.) ohne makroskopisch sichtbare Symptome von <i>Phytophthora</i> spp. (A)	Sediment (S)	3a AS
	b wie a (A)	Sediment (S)	3b AS
	c Ablaufschacht (unterirdisch) einer Kulturfläche (<i>Taxus</i> spec.) ohne makroskopisch sichtbare Symptome von <i>Phytophthora</i> spp. (A)	Sediment (S)	3c AS
	a Teich (T)	Wasser (W)	3a TW
	a Teich (T)	Sediment (S)	3a TS
	b Teich (T)	Wasser (W)	3b TW
	b Teich (T)	Sediment (S)	3b TS
	Brunnen (B)	Wasser (W)	3 BW
4	Ablauf (unterirdisch) mehrerer Kulturflächen (A)	Sediment (S)	4 AS
	Teich (T)	Wasser (W)	4 TW
	Teich (T)	Sediment (S)	4 TS
	Brunnen (B)	Wasser (W)	4 BW

¹⁾ Pflanzen wiesen typische Welke- und Trockenheitssymptome auf, von entnommenen Pflanzen dieser Kulturflächen konnte mehrfach *Phytophthora* spp. isoliert werden

2.4.4 Probenahmetermine

In kontinuierlichen Zeitabständen von sieben bis acht Wochen wurden über den Zeitraum von 14 Monaten die Praxisbetriebe beprobt (Tab. 7).

Tabelle 7: Probenahmetermine in den Praxisbetrieben

Termin	Datum	Abkürzung
1	29.08.94	Aug
2	24.10.94	Okt
3	28.11.94	Nov
4	06.02.95	Febr
5	27.03.95	März
6	15.05.95	Mai
7	11.07.95	Juli

2.5 Nachweisverfahren

2.5.1 Probenmaterial, -vorbereitung und -mengen

In den Untersuchungen unter kontrollierten Bedingungen wurden als Proben in den angegebenen Mengen, gegebenenfalls nach entsprechender Vorbehandlung, alle unter 2.3 aufgeführten Kulturen auf festen und in flüssigen Nährmedien, sowie Zoosporen, in den Praxisuntersuchungen die entnommenen Wasser- und Sedimentproben eingesetzt (Tab. 8).

Die Wasser- bzw. Sedimentproben aus den Praxisbetrieben wurden unmittelbar nach dem Transport für 24 Stunden kühl gelagert (+ 4 °C), gut durchmischt und entsprechend portioniert, bevor sie aufbereitet wurden. Alle unter den jeweiligen Nachweisverfahren angegebenen Positiv- und Negativkontrollen wurden exakt wie die Proben vorbehandelt, in den gleichen Mengen abgemessen und in den Verfahren verwendet.

Versuchstechnisch bedingt mussten Wasserproben vor den Untersuchungen z.T. gefiltert (z.B. im DAS-ELISA, siehe 2.5.2) werden, dies geschah mit einem Aufsatz zur Sterilfiltration (SATORIUS, Göttingen) und einer angeschlossenen Vakuumpumpe. Nach jeder Probe wurde der Aufsatz mit 70 %igem Ethanol desinfiziert und anschließend zweimal mit *aqua dest.* gespült. Verwendet wurden Filter mit der Porenweite 8 µm (SCHLEICHER & SCHUELL, AE99, Nr. 400 114, Ø 5 cm), da die Zoosporen als kleinste Verbreitungseinheit der *Phytophthora*-Arten diesen Porendurchmesser nicht mehr passieren können (PITTIS & COLHOUN 1983). Für den DAS-ELISA wurden die Überstände der Sedimentproben aufgearbeitet und untersucht.

Tabelle 8: Probenmaterial, -vorbereitung und -mengen in den Nachweisverfahren

Material	Probenvorbereitung	Probenmenge
DAS-ELISA		
Strukturen in flüssigen Nährmedien (siehe 2.3.2)	Flüssigkulturen wurden gefiltert, mit <i>aqua deion.</i> gewaschen und gefriergetrocknet ²⁾ , die Proben wurden bis zur Verwendung tiefgekühlt (- 60 °C) gelagert	Pro Napf = pro 200 µl aufgearbeitete Probe 1:20.000 mit Probenpuffer (PP) verdünnt
Zoosporen (siehe 2.3.3)	—	Pro Napf = pro 200 µl Eingesetzte Zoosporenkonzentrationen: Zoosporen pro Testansatz und Endkonzentration 20.000 pro 200 µl = 100.000 pro ml = 1 pro 10 nl 10.000 pro 200 µl = 50.000 pro ml = 1 pro 20 nl 2.000 pro 200 µl = 10.000 pro ml = 1 pro 100 nl 1.000 pro 200 µl = 5.000 pro ml = 1 pro 200 nl 200 pro 200 µl = 1.000 pro ml = 1 pro 1.000 nl (1 µl) 100 pro 200 µl = 500 pro ml = 1 pro 2.000 nl (2 µl) 20 pro 200 µl = 100 pro ml = 1 pro 10 µl 10 pro 200 µl = 50 pro ml = 1 pro 20 µl 2 pro 200 µl = 10 pro ml = 1 pro 100 µl
Wasser	Proben wurden gefiltert ¹⁾ , vakuumverschweißt und bis zur Verwendung tiefgekühlt (- 60 °C) gelagert	Pro Napf = pro 200 µl aufgearbeitete Probe (500 ml) mit PP verdünnt
Sediment ⁴⁾	Proben wurden mit 250 ml <i>aqua deion.</i> vermengt, 5 Tage bei RT inkubiert und danach der Überstand gefiltert ¹⁾ , die Proben wurden vakuumverschweißt und bis zur Verwendung tiefgekühlt (- 60 °C) gelagert	Pro Napf = pro 200 µl aufgearbeitete (250 ml) Probe mit PP verdünnt
Mikrobiologische Techniken: Vegetatives Wachstum auf Nähr- und Selektivmedien und Direkte Isolierung		
Strukturen auf festen Nährmedien (siehe 2.3.1)	—	Pro Selektivmediumplatte Kulturplättchen (Ø 1 cm)
Wasser	Proben wurden gefiltert ¹⁾	Pro Selektivmediumplatte ein Filter (500 ml gefilterte Probe)
Sediment	Probe wurde gesiebt und darin enthaltene Pflanzenreste wurden unter fließendem Leitungswasser gründlich gesäubert und ausgelegt	Pro Selektivmediumplatte fünf Pflanzenreststückchen aus 500 ml Probe

Fortsetzung **Tabelle 8**

Material	Probenvorbereitung	Probenmenge
Apfeltest		
Strukturen auf festen Nährmedien (siehe 2.3.1)	—	Pro Inokulationspunkt ein Kulturplättchen (Ø 1 cm)
Zoosporen (siehe 2.3.3)	—	Pro Inokulationspunkt = pro 100 µl Eingesetzte Zoosporenkonzentrationen: Zoosporen pro Testansatz und Endkonzentration 10^4 = 10.000 pro 100 µl = 1 pro 0,01 µl 5.000 pro 100 µl = 1 pro 0,05 µl 10^3 = 1.000 pro 100 µl = 1 pro 0,1 µl 10^2 = 100 pro 100 µl = 1 pro 1 µl 10^1 = 10 pro 100 µl = 1 pro 10 µl 1 = 1 pro 100 µl = 1 pro 100 µl
Wasser	Proben wurden gefiltert ¹⁾ , der Filter zerteilt	Pro Inokulationspunkt ein Filterstückchen des zerteilten Filters mit 500 ml Probe
Sediment	—	Pro Inokulationspunkt etwa 1,5 ml Probe
Lupinentest		
Strukturen auf festen Nährmedien (siehe 2.3.1)	Kultur einer Petrischale wurde mit 100 ml <i>Trichum</i> ³⁾ / Sand Gemisch 4:1 (v/v) vermengt und 1000 ml <i>aqua deion.</i> zugegeben	Pro Gefäß = pro 1.000 ml = pro 20 Lupinensämlinge, Kultur einer Petrischale (Ø 9 cm)
Zoosporen (siehe 2.3.3)	—	Pro Gefäß = pro 1.000 ml = pro 20 Lupinensämlinge Eingesetzte Zoosporenkonzentrationen: Zoosporen pro Testansatz und Endkonzentration 10^5 = 100.000 pro 1.000 ml = 1 pro 10 µl 10^4 = 10.000 pro 1.000 ml = 1 pro 100 µl 5.000 pro 1.000 ml = 1 pro 500 µl 10^3 = 1.000 pro 1.000 ml = 1 pro 1.000 µl (1 ml) 10^2 = 100 pro 1.000 ml = 1 pro 10 ml 10^1 = 10 pro 1.000 ml = 1 pro 100 ml 1 = 1 pro 1.000 ml = 1 pro 1.000 ml
Wasser	—	Pro Gefäß = pro 500 ml = pro 20 Lupinensämlinge
Sediment	Proben wurden mit 250 ml <i>aqua deion.</i> vermengt	Pro Gefäß = pro 250 ml Probe = pro 20 Lupinensämlinge

Fortsetzung **Tabelle 8**

Material	Probenvorbereitung	Probenmenge
Rhododendronblatt (RHB)-Test		
Strukturen auf festen Nährmedien (siehe 2.3.1)	Kultur einer Petrischale wurde mit 100 ml Triohum ³⁾ / Sand Gemisch 4:1 (v/v) vermengt und 1000 ml <i>aqua deion.</i> zugegeben	Pro Gefäß = pro 1.000 ml = pro 10 RHB, Kultur einer Petrischale (Ø 9 cm)
Zoosporen (siehe 2.3.3)	—	Pro Gefäß = pro 1.000 ml = pro 10 RHB Eingesetzte Zoosporenkonzentrationen: Zoosporen pro Testansatz und Endkonzentration 10^5 = 100.000 pro 1.000 ml = 1 pro 10 µl 10^4 = 10.000 pro 1.000 ml = 1 pro 100 µl 5.000 pro 1.000 ml = 1 pro 500 µl 10^3 = 1.000 pro 1.000 ml = 1 pro 1.000 µl (1 ml) 10^2 = 100 pro 1.000 ml = 1 pro 10 ml 10^1 = 10 pro 1.000 ml = 1 pro 100 ml 1 = 1 pro 1.000 ml = 1 pro 1.000 ml
Wasser	—	Pro Gefäß = pro 500 ml = pro 10 RHB
Sediment	Proben wurden mit 250 ml <i>aqua deion.</i> vermengt	Pro Gefäß = pro 250 ml = pro 10 RHB

— direkt eingesetzt, ohne Vorbehandlung

¹⁾ SCHLEICHER & SCHUELL Nr. 400 1148, AE 99, Ø 50 mm

²⁾ Dies diente der Gewährleistung einer standardisierte Aufarbeitung mit gleichen Trockengewichten

³⁾ Triohum Pikiererde (pH 5,5: 210 mg / l N₂; 240 mg / l P₂O₅; 270 mg / l K₂O; 85 mg / l MgO); Klasmann-Deilmann Vertriebsgesellschaft Deutschland GmbH, Georg Klasmann Str. 2-10; 49 744 Geeste

⁴⁾ Im DAS-ELISA Verfahren wurden ausschließlich Sedimentüberstände untersucht

2.5.2 Serologisches Verfahren DAS-ELISA (*Double-Antibody-Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

A) Herstellung der polyklonalen Antiseren

Genutzt wurde für alle Untersuchungen ein direktes ELISA-Verfahren des DAS-Typs, der modifiziert nach WERRES (1987) durchgeführt wurde.

Für das serologische Verfahren wurden polyklonale Antiseren gegen zwei *Phytophthora*-Arten produziert, die hauptverantwortlich für die an Baumschulgehölzen bundesdeutscher Baumschulen entstehenden Schäden durch *Phytophthora* spp. gemacht werden. Eines war gegen das Isolat *P. cinnamomi* 8/88/92 gerichtet, das andere gegen das Isolat *P. cactorum* 9/88/92. Beide pilzähnlichen Mikroorganismen wurden in Flüssigkultur (siehe 2.3.2) bis zum Ende der logarithmischen Wachstumsphase, dies entsprach einer Anzuchtdauer von sieben Tagen für das Isolat *P. cinnamomi* 8/88/92 und sechs Tagen für *P. cactorum* 9/88/92, angezogen und geerntet. Die Kulturen wurden unter sterilen Bedingungen in Eppendorfgefäße

gefüllt, unmittelbar danach gefriergetrocknet und bis zur Verwendung bei - 60 °C eingefroren.

Die Immunisierung der Kaninchen, die Gewinnung und Aufarbeitung der beiden Antiseren wurde nach CLARK & ADAMS (1977) ausgeführt. Die Rohseren wurden mit Natriumazid in PBS (0,25 % = 10 µl / ml Serum) versetzt und bei + 4 / 8 °C in silikonisierten Glasgefäßen im Kühlschrank gelagert, ihr Titer mit einem Agardoppeldiffusionstest nach OUCHTERLONY (1964) geprüft. Das gegen *P. cinnamomi* 8/88/92 gerichtete Antiserum wurde aus dem Material der vierten Blutabnahme vom 02.02.93 und dasjenige gegen *P. cactorum* 9/88/92 aus dem Material der dritten Blutabnahme vom 19.03.93 gewonnen.

Die Gamma (γ)-globuline wurden am 31.03.93 (*P. cinnamomi* 8/88/92) bzw. am 18.02.93 (*P. cactorum* 9/88/92) analog CLARK & ADAMS (1977) gereinigt, photometrisch auf eine Extinktion von $E_{280\text{nm}} = 1,46$ für *P. cinnamomi* 8/88/92, Antiserum 556, bzw. $E_{280\text{nm}} = 1,44$ für *P. cactorum* 9/88/92; Antiserum 557, dies entspricht 1 mg Protein/ml, eingestellt und nach dem Zusatz von Natriumazid (0,25 % = 4 µl / ml Globulin) bei + 4 / 8 °C in silikonisierten Glasgefäßen im Kühlschrank aufbewahrt.

B) Durchführung und Standardisierung

Die Konjugate wurden wie bei CLARK & ADAMS (1977) beschrieben mit Alkalischer Phosphatase (BOEHRINGER Nr. 0567752) hergestellt. In allen durchgeführten Tests wurden dieselben γ-Globulin- und Konjugataufarbeitungen verwendet. Mit Hilfe einer (oder mehrerer, siehe unten) Konzentrationsplatte(n) gemäß der Anleitung bei CASPER & MEYER (1981) wurde die optimale Konzentration von γ-Globulin- und Konjugatverdünnung für die Serientestung mit dem ELISA bestimmt.

Verwendet wurden Mikrotiterplatten mit hoher Bindungskapazität (F-Form; GREINER Nr. 655061). Alle Puffer (Beschichtungs-, Wasch-, Konjugat-, Proben- und Substratpuffer) wurden entsprechend den Angaben von CASPER & MEYER (1981) hergestellt. Ein automatisches Mikrotiterplattenwaschgerät (Easy Washer EAW 812 SW 1 SLT Labinstruments Deutschland GmbH) wurde für alle Waschschrte benutzt. Die Inkubationsschritte der γ-Globuline und des Konjugates betrugen jeweils eine Stunde bei + 37 °C in einem Schüttler (Wellwarm 1, DENLEY INSTRUMENTS LIMITED) und drei Stunden bei RT (+ 18-22 °C) und natürlichem Tageslicht ohne Schütteln. Die Inkubation der Proben erfolgte über Nacht bei + 4 / 8 °C im Kühlschrank. Die photometrische Messung der ELISA-Werte erfolgte mit einem TITERTEK Multiscan Plus MCC/340 (FLOW LABORATORIES) monochromatisch, wenn die aufgearbeiteten Strukturen aus Flüssigkulturanzucht desjenigen *Phytophthora*-Isolates, gegen das das Antiserum produziert worden war (= Positivkontrolle, siehe 2.5.1) einen Extinktionswert ($E_{405\text{nm}}$) zwischen 0,7 - 1,1 exakt eine Stunde nach Zugabe von *p*-Nitrophenylphosphat als Substrat (BOEHRINGER Nr. 738352) erreichte. Damit wurde durch diese auf jeder ELISA-Platte mitgeführte Positivkontrolle der Messzeitpunkt eindeutig markiert. Des weiteren durchliefen Pro-

benpuffer als Blindwert und mit Probenpuffer im Verhältnis 1 : 100 verdünntes Anzuchtmedium (GS_{fl}, siehe 2.2.1) als Negativkontrolle jeden ELISA-Test.

Der angegebene Schwankungsbereich (Tab. 9) der erhaltenen Extinktionswerte für die unter Standardbedingungen angezogenen und aufgearbeiteten Flüssigkulturen mit denselben γ -Globulin-/Konjugatverdünnungen in PBS resultiert aus den aufgezeigten ELISA-Werten, die unter Einhaltung gleicher Rahmenbedingungen (Waschschritte, Puffer, Platten, Aufarbeitungen etc.) mit dem Testverfahren produziert worden sind. Da im Verlauf der Untersuchungen Extinktionsverluste des gefriergetrockneten standardisierten Materials von *P. cinnamomi* 8/88/92 bzw. *P. cactorum* 9/88/92 auftraten, deren Ursache vermutlich die Aufbewahrung über einen Zeitraum von bis zu sechs Monaten in Eppendorfgefäßen bei - 60 °C in der Tiefkühltruhe war, wurden innerhalb dieses Zeitraums mehrfach Konzentrationsplatten angelegt und die γ -Globulin-/Konjugatverdünnung entsprechend angesetzt, um in den vorgegebenen Extinktionsbereich zu gelangen.

Alle aufgeführten Bedingungen wie Inkubationszeiten und -temperaturen, automatisierter Waschvorgang, Mikrotiterplattenchargen usw. wurden während der Ausführung des ELISA konstant eingehalten.

Tabelle 9: Extinktionswerte im DAS-ELISA (E_{405nm}) von *P. cinnamomi* 8/88/92 und *P. cactorum* 9/88/92 aus Flüssigkulturanzucht mit der jeweils gleichen γ -Globulin-/ Konjugatverdünnung

Antiserum	Isolat	γ -Globulin-/Konjugatverdünnung mit PBS ¹⁾	E_{405nm}
556	<i>P. cinnamomi</i> 8/88/92	1 : 1000 / 1 : 1000	0,855 0,994 0,926 1,024 1,091 0,760
557	<i>P. cactorum</i> 9/88/92	1 : 2250 / 1 : 2250	0,854 0,938 0,763 0,767 0,905 0,963

¹⁾ PBS = phosphate buffered saline

C) Probenaufarbeitung

Aufgrund früherer Erfahrungen mit dem Testsystem (WERRES & THEMANN 1993) handelt es sich bei der Probenaufarbeitung um einen besonders sensiblen Bereich gegenüber Einflussfaktoren, die zu unspezifischen Hintergrundreaktionen führen können. Deshalb wurden

bereits bekannte Faktoren wie längerer Sauerstoffkontakt aufgetauter Proben oder hohe Temperaturen unbedingt vermieden. Während der gesamten Probenaufarbeitung wurde eine Kühlkette ununterbrochen aufrechterhalten. Alle Proben, die bei - 60 °C in der Tiefkühltruhe lagerten, wurden nicht länger als sechs Monate aufbewahrt und nach dem Auftauen nicht erneut eingefroren. Sämtliche Kontrollen wurden identisch aufgearbeitet.

0,015 g gefriergetrocknetes Material der Strukturen aus Flüssigkulturanzucht (siehe 2.3.2) wurden abgewogen, in vorgekühlten Mörsern zu feinem Pulver vermahlen, im Verhältnis 1 : 200 mit ELISA-Probenpuffer verdünnt und anschließend bei 3000 U / min (1370 g*) für zehn Minuten bei + 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde im Verhältnis 1 : 100 weiterverdünnt (mit ELISA-Probenpuffer, dies entsprach einer Endverdünnung von 1 : 20.000) und sofort eingefroren (- 60 °C).

Die Zoosporen (siehe 2.3.3) wurden nach dem Auszählen und Herstellen der Verdünnungsreihen als Zoosporensuspensionen für maximal zwei Stunden im Kühlschrank bei + 4 / 8 °C gelagert, bevor sie in die Vertiefungen der ELISA-Platten pipettiert wurden. Ebenso wurde mit den Negativkontrollen verfahren, wobei es sich um das jeweilige Medium der Zoosporeninduzierung handelte.

Die gefilterten Wasserproben und Sedimentüberstände (siehe 2.5.1) wurden nach der von ALI-SHTAYEH, MACDONALD & KABASHIMA 1991 beschriebenen Methode mit flüssigem Stickstoff aufgearbeitet. Anschließend wurden die Proben in 3 ml ELISA-Probenpuffer aufgenommen und bei - 60 °C tiefgefroren. Identisch aufgearbeitet wurden 500 ml gefiltertes Leitungswasser und der gefilterte Überstand eines Gemisches aus 250 ml Triohum und Sand im Verhältnis 4:1 (v/v) (siehe Tab. 8) und 250 ml *aqua deion.* als Negativkontrollen.

D) Schwellenwertbestimmung

Die Definition eines Schwellenwertes dient dazu, Extinktionswerte von Proben im ELISA in positive (= Nachweis des Erregers) und negative (= kein Nachweis des Erregers) Werte zu trennen. Ziel ist es, die Zahl der falsch-positiv (z. B. Hintergrundreaktionen) und falsch-negativ (z. B. Latenzphase) getesteten Proben möglichst gering zu halten. In der Literatur findet sich kein einheitliches Verfahren für eine Vorgehensweise für die Ermittlung dieses Wertes, sondern eine Vielzahl verschiedener Methoden (SUTULA *et al.* 1986). So wird der Wert z.T. rechnerisch ermittelt (MILLER, BHAT & SCHMITTHENNER 1994, OLSSON 1995, OLSSON 1999) oder aufgrund von Erfahrungen mit dem Testsystem festgelegt (PSCHEIDT *et al.* 1992, GABLER 1995).

Nach CONVERSE & MARTIN 1990 gibt es keinen absoluten Grenzwert zwischen Hintergrundreaktionen und dem Nachweis des Zielorganismus, so dass für jede Wirt/Erregerkombination das Testverfahren neu standardisiert werden muss, um einen spezifischen Schwellenwert festzulegen. Für diese Bestimmung sollten möglichst alle Faktoren, die das Testverfahren und die Reaktion zwischen Antigen und Antikörpern beeinflussen können, bekannt sein. Für

die Durchführung des Testverfahrens wurde daher eine größtmögliche Standardisierung vorgenommen (siehe oben) um bekannte Einflussfaktoren, insbesondere bei der Probenaufarbeitung, auszuschalten. Des weiteren wurden geeignete Kontrollen ausgewählt und auf jeder Platte mitgeführt, wie die verschiedenen Medien, in denen sich Strukturen der Erreger befanden, oder aber identisch aufgearbeitete Filter mit den entsprechenden Kontrollmedien.

Für das Testsystem wurden zwei Schwellenwerte festgelegt: Aufgrund der Testreaktion der Positiv- und Negativkontrollen, sowie der Standardisierung und den Erfahrungen mit den Einflussfaktoren, kann bei Extinktionswerten oberhalb von $E_{405nm} = 0,15$ nach Abzug des Puffer(=Blind)wertes, von einer positiven Probe ausgegangen werden. Die meisten der untersuchten Proben lagen deutlich oberhalb bzw. unterhalb dieses Wertes. Alle in Abhängigkeit der Untersuchung mitgeführten Negativkontrollen lagen im Extinktionsbereich des Puffers bzw. im Bereich unterhalb von $E_{405nm} = 0,1$ nach Abzug des Blindwertes (Tab. 10). Bei Werten von $E_{405nm} \leq 0,1$ handelt es sich daher um eine eindeutig negative Testreaktion. Der Extinktionsbereich zwischen den beiden Werten von $0,1 E_{405nm} < x < 0,15 E_{405nm}$, ist als eine Grauzone anzusehen, die aufgrund der bisherigen Erfahrungen, besonders systembedingter Schwankungen (siehe oben) keine eindeutige Aussage zum Untersuchungsergebnis zulässt.

Tabelle 10: Extinktionswerte im DAS-ELISA (E_{405nm}) verschiedener Negativkontrollen

	PBS ¹⁾ Puffer (= Blindwert)	Negativkontrolle			
		Leitungswasser	Leitungswasser, gefiltert	Azaleenerde-extrakt	Azaleenerde-extrakt, gefiltert
E_{405nm}	0,112	0,140	0,108	0,210	0,218
(Roh-	0,127	0,139	0,110	0,195	0,210
daten ²⁾)	0,130	0,163	0,140	0,253	0,147
	0,113	0,167	0,139	0,219	0,243
	0,104	0,144	0,146	0,153	0,189
	0,099	0,135	0,156	0,150	0,147
	0,093	0,119	0,145	0,194	0,173
	0,132	0,117	0,112	0,192	0,242

¹⁾ PBS = phosphate buffered saline

²⁾ ohne Mittelwertbildung und Blindwertabzug

2.5.3 Mikrobiologische Verfahren

2.5.3.1 Bestimmung des vegetativen Wachstums

In den *in vitro* Untersuchungen wurde das vegetative Wachstum ausgewählter *Phytophthora*-Arten auf verschiedenen Selektivmedien (siehe 2.2.2) untersucht (siehe Tab. 8). Die Isolate (siehe 2.1) wurden von MSCH (siehe 2.2.1) auf das jeweilige zu prüfende Medium angeimpft. Des weiteren diente das vegetative Wachstum auf festen Nährmedien zur Bestimmung

(siehe 2.6) unbekannter *Phytophthora* spp. aus Wasser- und Bodenproben, die über Köderpflanzen (siehe 2.5.4) oder direkt (siehe 2.5.3.2) isoliert worden waren.

Jeweils zwei Petrischalen pro Temperatur und Isolat wurden mit einem Myzelplättchen (\varnothing 1 cm) am Rand der Petrischale beimpft und nach 24 Stunden bei + 20 °C, dunkel, auf Klimaschränke mit den Temperaturen von je + 20 °C, + 28 °C und + 34 °C, dunkel, verteilt. Diese sogenannten Kardinalmesspunkte markieren die nach STAMPS *et al.* 1990 charakteristischen Wachstumsgrenzen bestimmter *Phytophthora*-Arten. Täglich nach genau 24 Stunden Inkubationszeit wurde das Wachstum kontrolliert. Dazu wurde die zurückgelegte Wachstumsstrecke in mm auf einer vorgezeichneten Linie an zwei Punkten im Winkel von 90 ° gemessen. Das Wachstum wurde über mindestens 14 Tage verfolgt und die Durchschnittswerte in mm pro 24 Stunden berechnet.

2.5.3.2 Direkte Isolierung

Die Wasser- und Sedimentproben aus den Baumschulen wurden (Mengen siehe Tab. 8) nach den unten beschriebenen Vorgehensweisen auf das Vorhandensein von *Phytophthora* spp. untersucht. Es wurde ausschließlich NVP Selektivmedium (siehe 2.2.2) verwendet. Die Petrischalen wurden bei + 20 °C, dunkel, inkubiert, bis zu 14 Tagen aufbewahrt und täglich mikroskopisch auf das Auswachsen von *Phytophthora* spp. hin kontrolliert. Auf diese Weise isolierte *Phytophthora* spp. wurden auf MSCH (siehe 2.2.1) abgeimpft und nach dem unter 2.6 beschriebenen Schema bestimmt.

A) Wasserproben

Die Wasserproben wurden gefiltert (siehe 2.5.1). Jeweils ein Filter wurde unter sterilen Bedingungen auf eine Petrischale mit Selektivmedium gelegt, und zwar so, dass die auf dem Filter verbliebenen Rückstände direkten Kontakt zur Agaroberfläche hatten. Nach einer Inkubationszeit von drei Tagen wurden die Filter entfernt und die Platten weiter inkubiert.

B) Sedimentproben

Alle untersuchten Sedimentproben enthielten Pflanzenreste (Blätter, Nadeln, Wurzelstücke etc.). Ein Teil dieser Reste wurde unter fließendem Leitungswasser gesäubert und wie bei dem unter 2.5.4 beschriebenen Verfahren für Köderpflanzen mit Natrium-Hypochlorid desinfiziert, gespült und getrocknet. Es wurden jeweils zwei Petrischalen mit je fünf Pflanzenreststückchen pro Probe ausgelegt.

2.5.4 Köderverfahren

Als Köder wurden unreife Äpfel (*Malus pumila* var. *domestica*) der Sorte 'Golden Delicious', Lupinensämlinge (*Lupinus angustifolius*) der Sorte 'Blue Stevens' und Blätter der *Rhododendron*-Hybride 'Cunningham's White' verwendet.

Die Zahl der verwendeten Köder pro Testansatz betrug im Apfeltest in den Untersuchungen vier Äpfel, im Lupinentest je 20 Sämlinge und im Rhododendronblatt-Test zehn Blätter. Positivkontrolle war bei allen Köderverfahren eine Kultur auf MSCH (siehe 2.2.1) von *P. cinnamomi* 8/88/92, die entweder direkt wie beim Apfeltest in die Inokulationspunkte appliziert oder aber wie bei den anderen beiden Verfahren unter das Substrat (Triohum/Sand Gemisch im Verhältnis 4:1 (v/v) gemischt und mit *aqua deion.* überschichtet wurde (siehe 2.5.1, Tab. 8). Unbeimpftes festes bzw. flüssiges Medium (siehe 2.2) des jeweiligen zu untersuchenden Materials (siehe 2.5.1, Tab. 8) wurde als Negativkontrolle in alle Tests einbezogen. Dazu kamen in den Untersuchungen mit Praxismaterial als weitere Negativkontrollen *aqua deion.* und ein Triohum/Sand Gemisch im Verhältnis 4:1 (v/v), das mit *aqua deion.* überschichtet worden war.

Waren jeweils keine Verbräunungen oder Verfärbungen an den Ködern erkennbar, die zum Auslegen geeignet waren, wurden zufällig ausgewählte Stückchen ausgelegt. In den Untersuchungen unter kontrollierten Bedingungen wurde ausschließlich MSCH, in den Untersuchungen mit Praxismaterial zusätzlich in derselben Anzahl Petrischalen NVP (siehe 2.2.2) als Medien verwendet. In allen drei Köderverfahren wurden sämtliche Petrischalen bei + 20 °C, dunkel inkubiert und nach fünf bzw. noch einmal nach zehn Tagen mikroskopisch auf den Auswuchs von *Phytophthora* spp. hin kontrolliert. Aus den Ködern auswachsende *Phytophthora* spp. (Abb. 9) wurden zunächst auf MSCH abgeimpft, mikroskopisch untersucht und danach Reinkulturen (siehe 2.6.1) hergestellt.



Abb. 9: Auswuchs von *Phytophthora* spp. aus ausgelegten Rhododendronblattstücken

2.5.4.1 Apfeltest

Der Apfeltest (CAMPBELL 1949) ist eines der ältesten, gängigsten und genutzten Verfahren weltweit zum Nachweis von *Phytophthora*-Arten. Er erfasst ein weites Spektrum an Arten, während gleichzeitig andere Erreger durch den niedrigen pH-Wert im Fruchtfleisch gehemmt sind, was für die Isolierung der relativ langsam wachsenden *Phytophthora*-Arten von Vorteil ist (ERWIN & RIBEIRO 1996). Für das modifiziert ausgeführte Verfahren (Abb. 10) wurden unbehandelte Äpfel möglichst ohne Schorfflecken ausgewählt. Sie wurden etwa acht bis zehn Wochen vor der Reife geerntet und bei + 4 °C bis zur Verwendung in Plastiktüten gelagert. Vor dem Einsatz in den Untersuchungen wurden die Äpfel unter fließendem Leitungswasser gewaschen und die Schale mit 70 %igem Ethanol abgerieben. Unter sterilen Bedingungen wurde mit einem abgeflammt Korkbohrer (Ø 1 cm) in etwa gleichen Abständen an drei Stellen des Apfels Fruchtfleisch entnommen. In die ausgestanzten Löcher wurden die Proben in das Apfelgewebe appliziert, die Inokulationspunkte (Ø 1 cm) mit dem Rest des Fruchtfleisches und der Schale wieder verschlossen und mit Parafilm umwickelt. Jeder Apfel wurde auf einen Plastikring so in eine mit feuchtem Filterpapier ausgelegte Kunststoffschale mit Deckel gesetzt, dass kein direkter Kontakt mit dem Boden und benachbarten Äpfeln bestand. Die Äpfel wurden für mindestens sieben Tage bei RT (+ 18-22 °C) und normaler Tageslänge (10 Std) inkubiert und täglich auf Verbräunungen der Inokulationsstellen hin bonitiert. Betrug der Durchmesser der Verbräunung ungefähr 3 cm, wurde deren Oberfläche unter sterilen Bedingungen mit einem Skalpell eingeritzt, die Schale entfernt und Stückchen des darunter liegenden Apfelgewebes auf festen Medien ausgelegt.

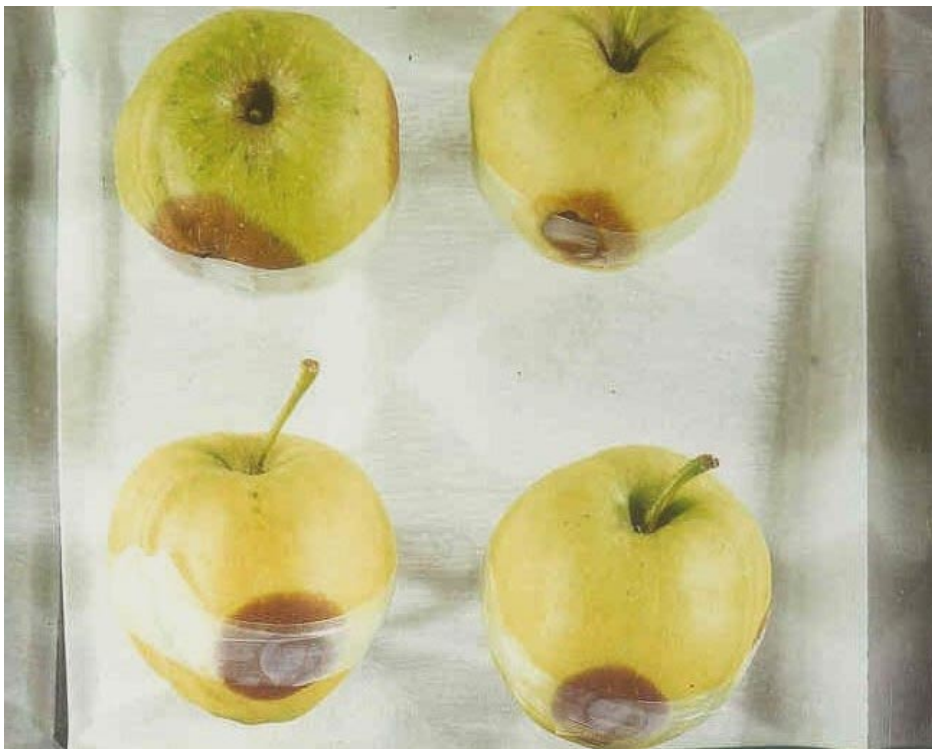


Abb. 10: Ködertest mit Äpfeln; Äpfel mit den von *Phytophthora* spp. verursachten typischen Verbräunungen

2.5.4.2 Lupinentest

Als besonders für den Nachweis von *P. cinnamomi* sehr geeignetes und empfindliches Verfahren gilt der Lupinentest nach CHEE & NEWHOOK (1965). Das Testverfahren wurde modifiziert durchgeführt. Lupinensamen der Sorte 'Blue Stevens' wurden mit 70 %igem Ethanol für eine Minute oberflächensterilisiert, anschließend zweimal mit sterilem *aqua dest.* gewaschen und in mit grobem angefeuchteten sterilem Filterpapier ausgelegten Kunststoffschalen (BRIETZKE GmbH, siehe unten) mit kontinuierlicher Wasserversorgung bei + 23/25 °C Tag/Nacht-Rhythmus (12 Std Licht / 12 Std Dunkelheit) zum Keimen gebracht. Nach sieben Tagen Inkubation wurden Sämlinge mit einer Hauptwurzellänge von 4 - 5 cm für den Test ausgewählt, da sie nach CHEE & NEWHOOK (1965) in diesem Stadium besonders empfindlich für eine Infektion durch *Phytophthora* spp. sind.

Der Lupinentest (Abb. 11) wurde in durchsichtigen Kunststoffschalen (11,5 x 18,5 x 5 cm) mit Deckeln (BRIETZKE GmbH, 10553 Berlin; Kühlschrank-Stapelboxen Nr. 321) durchgeführt, in die die zu untersuchenden Proben gefüllt wurden. Ein Kunststoffnetz (ca. 14 x 22 cm; Maschenweite 5 mm) diente der Fixierung der Lupinen. Es wurde mit Hilfe von Klebestreifen über die gesamte Oberfläche der Schale gespannt und die Sämlinge durch die Maschen gesteckt, so dass sich die Hauptwurzeln im Wasser befanden. Danach wurden die Schalen vier Tage bei RT (+ 18-22 °C) und natürlicher Tageslänge (10 Std) inkubiert. Zur Auswertung wurden die Sämlinge dann aus den Schalen entfernt, ihre Hauptwurzeln mit einem Skalpell abgetrennt und auf Verbräunungen hin bonitiert (Abb. 12). Die Wurzeln wurden mit einer Natrium-Hypochloridlösung (0,037 % aktives Chlor) eine Minute oberflächensterilisiert, anschließend zweimal in sterilem *aqua dest.* gewaschen und auf sterilem Filterpapier getrocknet. Die verbräunten Wurzeln wurden mit dem Skalpell in dünne Scheiben geschnitten und auf festen Medien ausgelegt.



Abb. 11: Ködertest mit Lupinensämlingen



Abb. 12: Lupinen mit den von *Phytophthora* spp. verursachten typischen Verbräunungen der Hauptwurzeln (rechts), links Negativkontrolle

2.5.4.3 Rhododendronblatt-Test

Bereits SHEW & BENSON 1982 verwendeten mit Korkbohrern ausgestanzte Rhododendron- und Azaleenblattscheiben zum Ködern von *P. cinnamomi*. In *in vitro* Untersuchungen (THEMANN & WERRES 1998) mit ganzen, unverletzten Blättern unterschiedlicher Altersstufen der *Rhododendron*-Hybride 'Cunningham's White' erwiesen sich die Blätter als einfach zu handhabende Köder, die ein breites Spektrum an *Phytophthora* spp. aus Wurzel- und Bodenproben köderten (Abb.13). Die Pflanzen wurden im Gewächshaus bei + 20 °C und natürlicher Tageslänge kultiviert. Nach dem Ernten der Blätter, unmittelbar vor den Versuchen, wurden diese unter fließendem Leitungswasser gründlich gesäubert und vorsichtig mit Filterpapier trockengetupft. Für die Ausführung wurden ebenfalls wie beim Lupinentest Kunststoffschalen (siehe 2.5.4.2) verwendet, in die das zu untersuchende Probenmaterial eingefüllt wurde. Die Rhododendronblätter wurden mit der Blattunterseite auf die Wasseroberfläche der zu untersuchenden Probe in die Schalen gelegt, und diese dann mit einem luftdurchlässigen Deckel verschlossen. Nach sieben Tagen Inkubation bei RT (+ 18-22 °C) und natürlicher Tageslänge (10 Std) wurden die Blätter aus den Schalen entfernt, gründlich unter fließendem Leitungswasser gereinigt und einzeln auf die für *Phytophthora* spp. typischen Flecken bonitiert. Diese Flecke in den Interkostalflächen sind deutlich vom umliegenden Gewebe abgegrenzt und sind mit bloßem Auge deutlich auf der Blattober- und unterseite erkennbar (Abb. 14). Die Blätter wurden analog dem Lupinentest (siehe 2.5.4.2) oberflächensterilisiert, gespült und trockengetupft. Dann wurden unter sterilen Bedingungen mit dem Skalpell kleine Stückchen von den verfärbten Blattzonen an unterschiedlichen Stellen entnommen und auf festen Medien ausgelegt.



Abb. 13: Ködertest mit Rhododendronblättern



Abb. 14: Rhododendronblätter mit von *Phytophthora* spp. verursachten typischen scharf abgegrenzten Flecken (Blattunterseite)

2.6 Taxonomische Untersuchungen

2.6.1 Herstellung von Reinkulturen

Die aus dem Praxismaterial isolierten pilzähnlichen Mikroorganismen und Pilze wurden auf Wasser-Agarplatten (siehe 2.2.1) abgeimpft, die in der Mitte einen sterilen Glasring enthielten, der dazu diente, mitauswachsende Bakterien zurückzuhalten und die unter dem Ring durchwachsenden Hyphen zu vereinzeln („VAN TIEGHAM cell method“, ERWIN & RIBEIRO 1996, S. 18). Die Isolate wurden bei + 20 °C, dunkel inkubiert und regelmäßig kontrolliert. Mit Hilfe eines Invertmikroskops wurden unter sterilen Bedingungen Hyphenspitzen abgenommen, auf Wasseragar überimpft und bei + 20 °C, dunkel inkubiert. Nach der mikroskopischen Kontrolle jedes Isolats auf charakteristische *Phytophthora*-Merkmale hin, wie z.B. unseptiertes Myzel oder Bildung von Sporangien oder Oogonien, wurden sie zur weiteren Bestimmung auf MSCH-Agar abgeimpft und bei + 20 °C, dunkel inkubiert.

2.6.2 Bestimmung isolierter *Phytophthora* spp. aus Baumschulen

Aufgrund der Vielzahl der aus den Wasser- und Sedimentuntersuchungen der Baumschulen erhaltenen *Phytophthora*-Isolate konnte nicht mit allen Reinkulturen eine Artbestimmung durchgeführt werden. Vorrangig wurden die Isolate aus Teichen untersucht, da es sich hierbei um die zentrale Sammelstelle des Wassers aller angeschlossenen Containerkulturflächen und gleichzeitig den Entnahmeort zur Bewässerung der Pflanzen handelt.

Die Artbestimmung der *Phytophthora*-Isolate erfolgte anhand der asexuellen und sexuellen Stadien unter Zuhilfenahme der Bestimmungsschlüssel von WATERHOUSE 1963, KRÖBER 1985, STAMPS *et al.* 1990, GERRETSON-CORNELL 1994 und der Artbeschreibungen in ERWIN & RIBEIRO 1996. Ergaben sich geringfügige Abweichungen von in der Literatur angegebenen Messwerten von Organen, wie Sporangien oder Oogonien und stimmten die zu bestimmenden Isolate ansonsten mit den Beschreibungen und Maßen einer *Phytophthora*-Art überein, wurden diese Isolate der Art zugeordnet, im folgenden aber als *confer* (cf.) bezeichnet.

Zunächst erfolgte die Bestimmung der Temperatur-Kardinalpunkte für das Wachstum (siehe 2.5.3.1). Isolate, die aus ein und derselben Probe zu einem Probenahmezeitpunkt und mit Hilfe desselben Verfahrens geködert wurden und die sowohl morphologisch als auch von der Wachstumsgeschwindigkeit her gleich waren, wurden zur Vereinfachung für das weitere Bestimmungsverfahren zusammengefasst. Stellvertretend wurde ein Isolat ausgewählt und mit diesem die weiteren Tests durchgeführt.

Als nächstes wurden die Wachstumsmuster der Isolate auf dem MSCH-Agar mit bekannten Isolaten aus der Stammkultur verglichen und festgehalten. Auf dem Medium bereits vorhandene charakteristische Merkmale wie z.B. Hyphenschwellungen oder Chlamydosporen wurden unter dem Mikroskop ausgemessen und notiert. Zur weiteren Bestimmung erfolgte die

Induzierung der Sporangien- bzw. Zoosporenbildung in Azaleenerdeextrakt (siehe 2.3.2) zunächst bei + 23 / 25 °C, dunkel. Wurden unter diesen Bedingungen keine Sporangien gebildet, wurde das Verfahren bei + 15 °C, dunkel wiederholt. War auch dann die Induzierung nicht erfolgreich, so wurde der Versuch komplett mit sterilem *aqua dest.* wiederholt.

Die gebildeten Sporangien wurden anhand ihrer charakteristischer Merkmale (Ausprägung der Papille, Größe, Längen-Breiten-Verhältnis, Form, vom Träger abfallend, usw.) nach STAMPS *et al.* 1990 eingeordnet, dabei wurden mindestens 25 Sporangien pro Isolat mikroskopisch ausgewertet. Aufgrund der bis zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Daten konnte mit Hilfe parallel mitgeführter definierter Vergleichsisolate aus der Stammkultur meist eine Einteilung in sogenannte WATERHOUSE-Gruppen (STAMPS *et al.* 1990) vorgenommen werden.

Für die weitere Bestimmung wurden die sexuellen Stadien bewertet. Dazu wurden alle Isolate auf MSCH-Agarplatten angeimpft, bei Optimaltemperatur, dunkel für 14 Tage inkubiert und auf das Vorhandensein von Antheridien, Oogonien und Oosporen hin mikroskopisch untersucht. Bei homothallischen Isolaten wurden die Eigenschaften der auf dem Agar gebildeten sexuellen Organe hinzugezogen. Vorhandene Antheridien, Oogonien und Oosporen wurden mikroskopisch untersucht und ihre charakteristischen Bestimmungsmerkmale wie Größe, Form, usw. ausgewertet und ebenfalls mit Hilfe der Bestimmungsschlüssel und aus der Stammkultur hinzugezogener Vergleichsisolate eingeordnet. Heterothallische Isolate, d.h. diejenigen, die zur Bildung der sexuellen Stadien einen geeigneten Partner benötigen, wurden auf MSCH-Agar mit Isolat aus der entsprechenden WATERHOUSE-Gruppe gekreuzt, um Antheridien, Oogonien und Oosporen zu erzeugen. Gelang dies nicht, oder konnte die gefundene Art mit Hilfe zusätzlich hinzugezogener Bestimmungsschlüssel (KRÖBER 1985, GERRETTSON-CORNELL 1994) nicht eindeutig zugeordnet werden, so wurde versucht, zumindest eine Eingruppierung in eine der WATERHOUSE-Gruppen vorzunehmen.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis von *Phytophthora*-Arten unter kontrollierten Bedingungen

Das gewünschte Maß an Spezifität und Sensitivität eines Nachweisverfahrens hängt vom Ziel der Untersuchungen und der jeweiligen Fragestellung ab. Die ausgewählten Nachweisverfahren für *Phytophthora*-Arten in Baumschulen sollen möglichst nur pilzähnliche Mikroorganismen der Gattung *Phytophthora* erfassen, vor allem die Arten *P. cinnamomi*, *P. cactorum*, *P. citricola*, *P. drechsleri* und *P. cryptogea*, die laut Pflanzenschutzdienst zu den in bundesdeutschen Baumschulen vornehmlichen Schaderregern an Gehölzen gehören.

Für den Nachweis im Wasser müssen außerdem die Zoosporen, die Hauptverbreitungsgorgane der Gattung *Phytophthora*, deren Bildung nur in Gegenwart von Flüssigkeit erfolgt, detektiert werden. Auch geringe Mengen dieser Verbreitungsgorgane sollen noch nachgewiesen werden, da Schwellenwerte, die zu einer Infektion führen bislang nicht bekannt bzw. umstritten sind (BENSON & JONES 1980; SHEW & BENSON 1982; BRUCK & KENERLEY 1983; KOLB 1986).

3.1.1 Serologisches Verfahren DAS-ELISA

3.1.1.1 Spezifität der polyklonalen Antiseren

- Strukturen in Flüssigkultur

Die gegen in Flüssigkultur gebildeten Strukturen (siehe 2.3.2) von *P. cactorum* und *P. cinnamomi* hergestellten polyklonalen Antiseren erwiesen sich im ELISA als gattungsspezifisch (Abb. 15 und 16 a, b). Die Extinktionswerte der geprüften eng verwandten Isolate der Gattung *Pythium* und den weiter entfernt verwandten bodenbürtigen Schaderregern *Verticillium albo-atrum*, *Verticillium dahliae* und *Cylindrocladium scoparium* lagen weit unterhalb des ermittelten Schwellenwertes für eine positive ELISA-Reaktion von 0,15 E_{405nm} (siehe 2.5.2).

Keines der mitgetesteten Medien führte bei beiden Antiseren zu einer Reaktion im ELISA (Abb. 15 a, b).

Beide Antiseren waren nicht artspezifisch, es zeigten sich Kreuzreaktionen mit den anderen geprüften *Phytophthora*-Arten im ELISA (Abb. 16 a, b). Dasjenige Isolat, gegen dessen Strukturen das Antiserum hergestellt wurde (*P. cinnamomi* 8/88/92 mit *P. cinnamomi* 8/88/92 und *P. cactorum* 9/88/92 mit *P. cactorum* 9/88/92) reagierte mit dem entsprechenden Antiserum jeweils am stärksten, und zwar für *P. cinnamomi* 8/88/92 bei 1,091 E_{405nm} und *P. cactorum* 9/88/92 bei 0,939 E_{405nm}. Das gegen *P. cinnamomi* 8/88/92 hergestellte Antiserum kreuzreagierte am stärksten mit den Isolaten von *P. cactorum* und *P. cryptogea* – die Isolate hatten Extinktionswerte im ELISA von 1,064 E_{405nm} bzw. 0,981 E_{405nm} und lagen damit

sehr nahe an dem Wert von *P. cinnamomi* – und am schwächsten mit demjenigen von *P. erythroseptica* mit 0,476 E_{405nm} . Das gegen *P. cactorum* 9/88/92 gerichtete Antiserum zeigte die höchste Kreuzreaktion mit dem *P. megasperma* Isolat, der Extinktionswert lag aber mit 0,734 E_{405nm} deutlich unter dem von *P. cactorum*. Am schwächsten reagierte das Antiserum mit dem Isolat von *P. richardiae* (0,268 E_{405nm}).

Die Reaktion beider Antiseren im ELISA war unabhängig von der jeweiligen WATERHOUSE-Gruppe der getesteten *Phytophthora*-Arten (Abb. 16 a, b).

Keine positive ELISA-Reaktion ergab sich bei beiden Antiseren mit den mitgeführten Nährmedien (Abb. 16 a, b).

- Zoosporen

Beide polyklonalen Antiseren reagierten mit Zoosporen (Abb. 17). Obwohl die Antiseren gegen verschiedene *Phytophthora*-Arten produziert worden waren, ergaben die Zoosporen unabhängig von der jeweiligen *Phytophthora*-Art mit beiden Antiseren einen nahezu gleichen Extinktionswert. In welcher Höhe die beiden Antiseren mit der immer gleichen Zoosporenmenge, nämlich 1000 Zoosporen pro ml (eine Zoospore pro μ l, siehe 2.5.1, Tab. 8) reagierten, hing aber von der *Phytophthora*-Art ab (Abb. 17).

Sowohl das gegen *P. cactorum* 9/88/92 als auch das gegen *P. cinnamomi* 8/88/92 gerichtete Antiserum reagierten am empfindlichsten mit den Zoosporen des Isolates *P. cactorum* 9/88/92 aus der WATERHOUSE-Gruppe I (Abb. 17). Die Extinktionswerte betrugen 0,852 E_{405nm} bzw. 0,819 E_{405nm} und entsprachen damit nahezu dem Wert der jeweiligen Positivkontrollen. Alle aus den übrigen WATERHOUSE-Gruppen III, bzw. VI geprüften *Phytophthora*-Arten ergaben Extinktionswerte, die maximal bis zu einem Drittel des Wertes für *P. cactorum* 9/88/92 betrugen. Am schlechtesten reagierten beide Antiseren mit den Zoosporenmengen von *P. cinnamomi* 8/88/92 und *P. citricola* 1490. Für diese beiden Isolate ergaben sich Extinktionswerte unterhalb des Schwellenwertes für eine positive ELISA-Reaktion (siehe 2.5.2), und zwar bei *P. citricola* 0,042 E_{405nm} bzw. 0,025 E_{405nm} und *P. cinnamomi* 0,13 E_{405nm} bzw. 0,1 E_{405nm} .

Keines der mitgeführten Medien führte bei beiden Antiseren zu einer Reaktion im ELISA (Abb. 17).

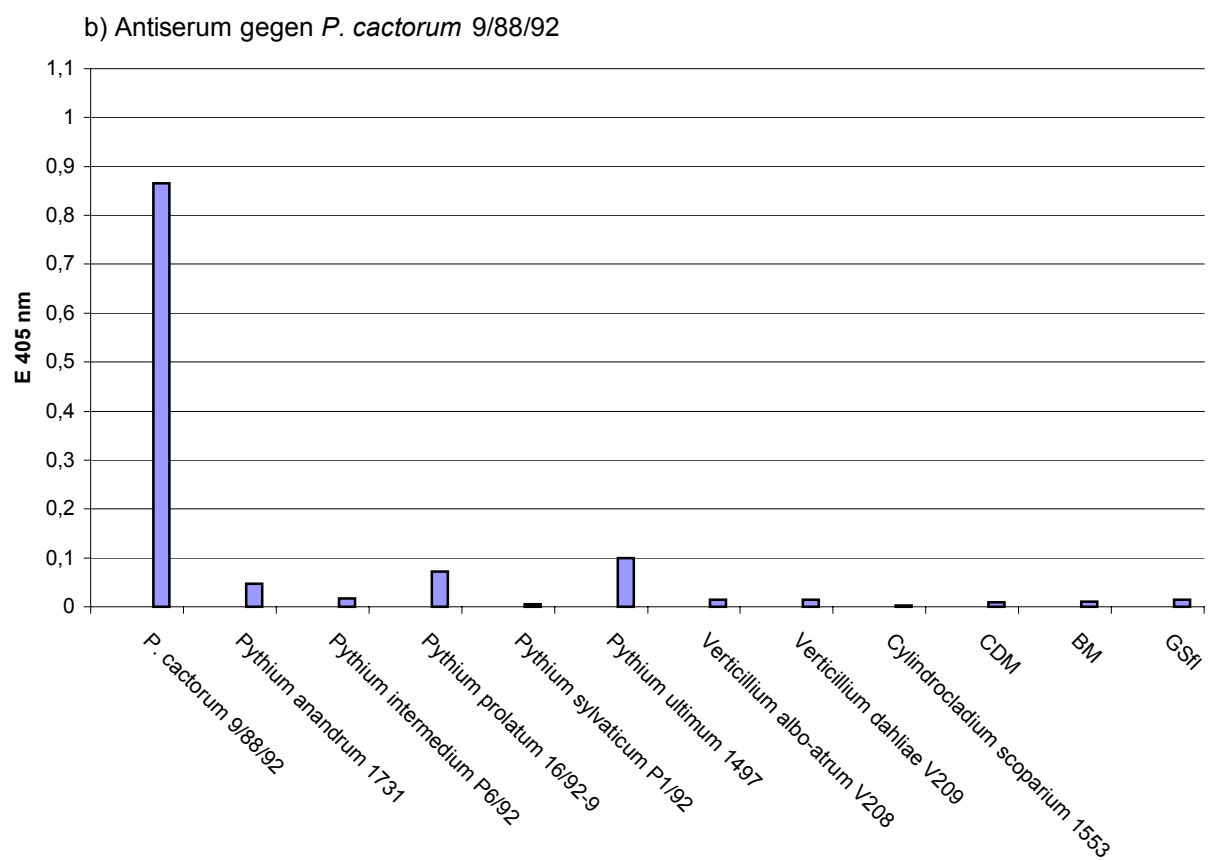
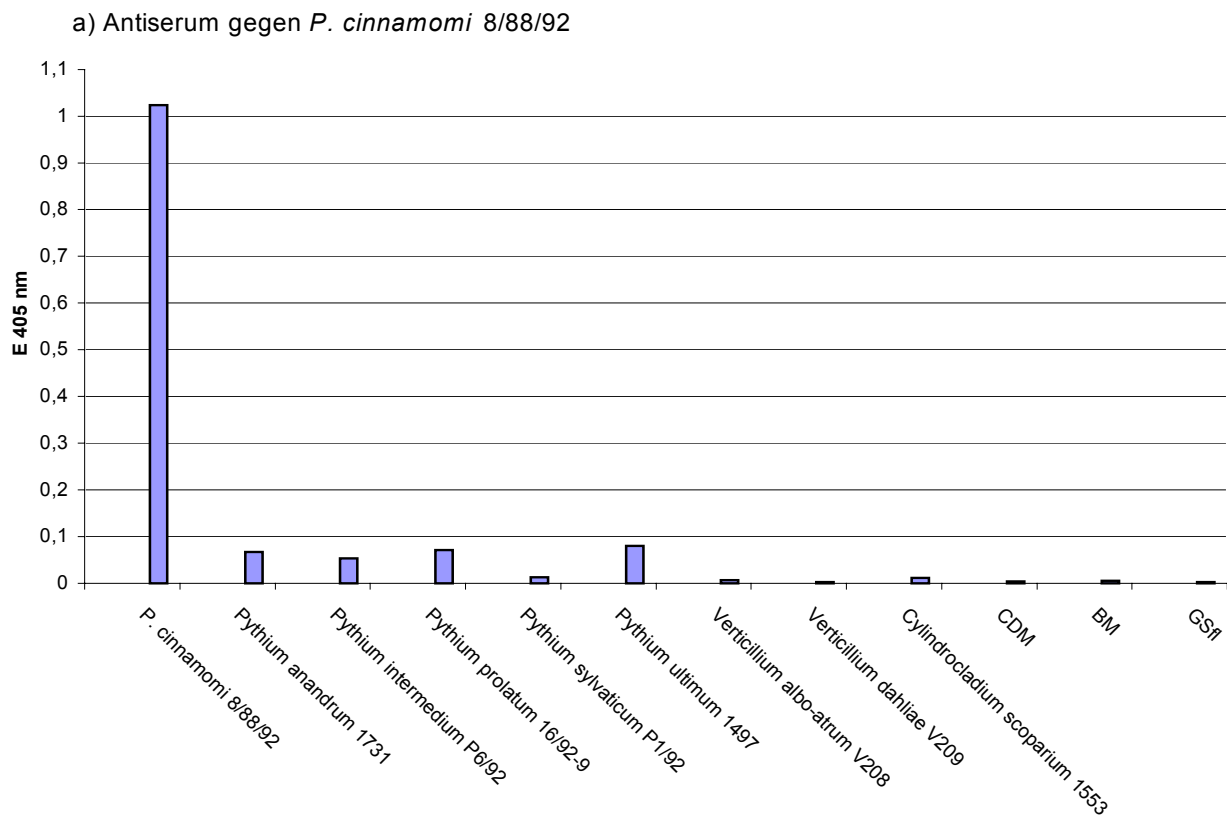


Abb. 15 a, b: Extinktionswerte der polyklonalen Antiseren mit *Pythium*-Arten und anderen Pilzen im DAS-ELISA (CDM, BM, GSfl = flüssige Nährmedien, siehe 2.3.2)

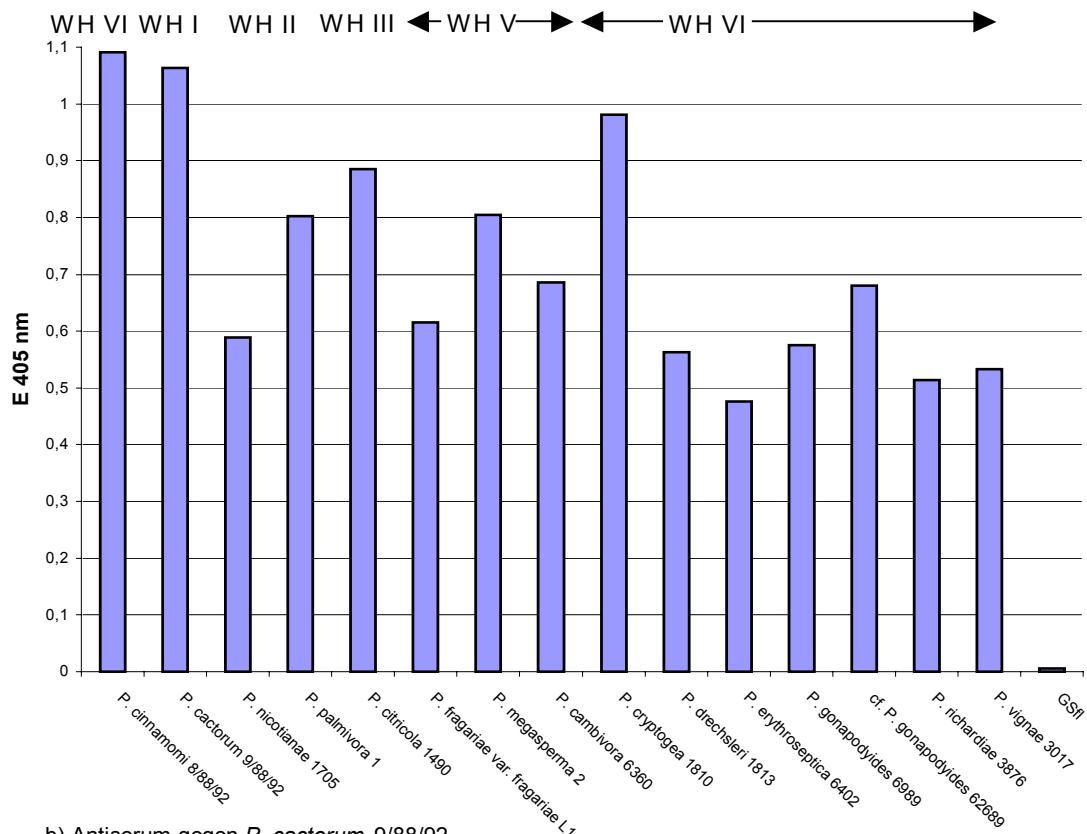
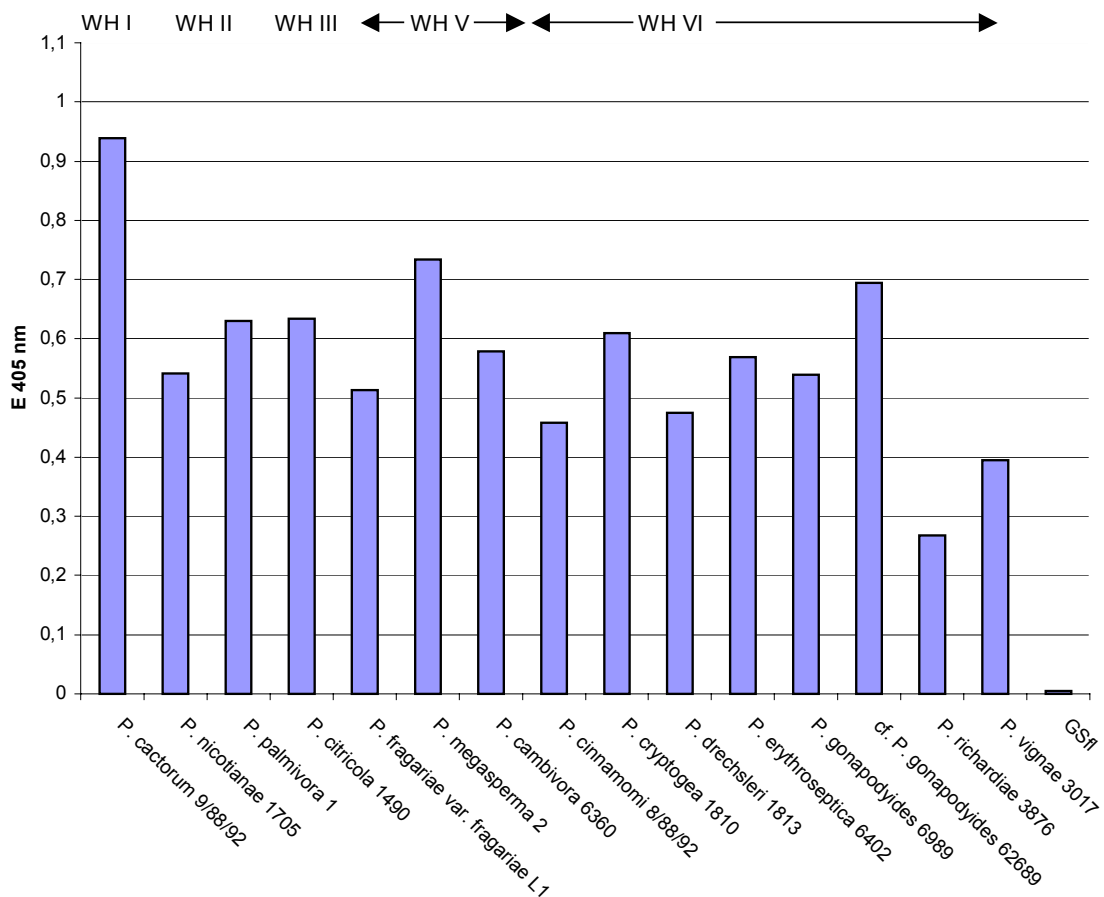
a) Antiserum gegen *P. cinnamomi* 8/88/92b) Antiserum gegen *P. cactorum* 9/88/92

Abb. 16 a, b: Extinktionswerte der polyklonalen Antiseren mit *Phytophthora*-Arten im DAS - ELISA (WH = Einteilung nach STAMPS *et al.* 1990; GSfl = flüssiges Nährmedium, siehe 2.3.2)

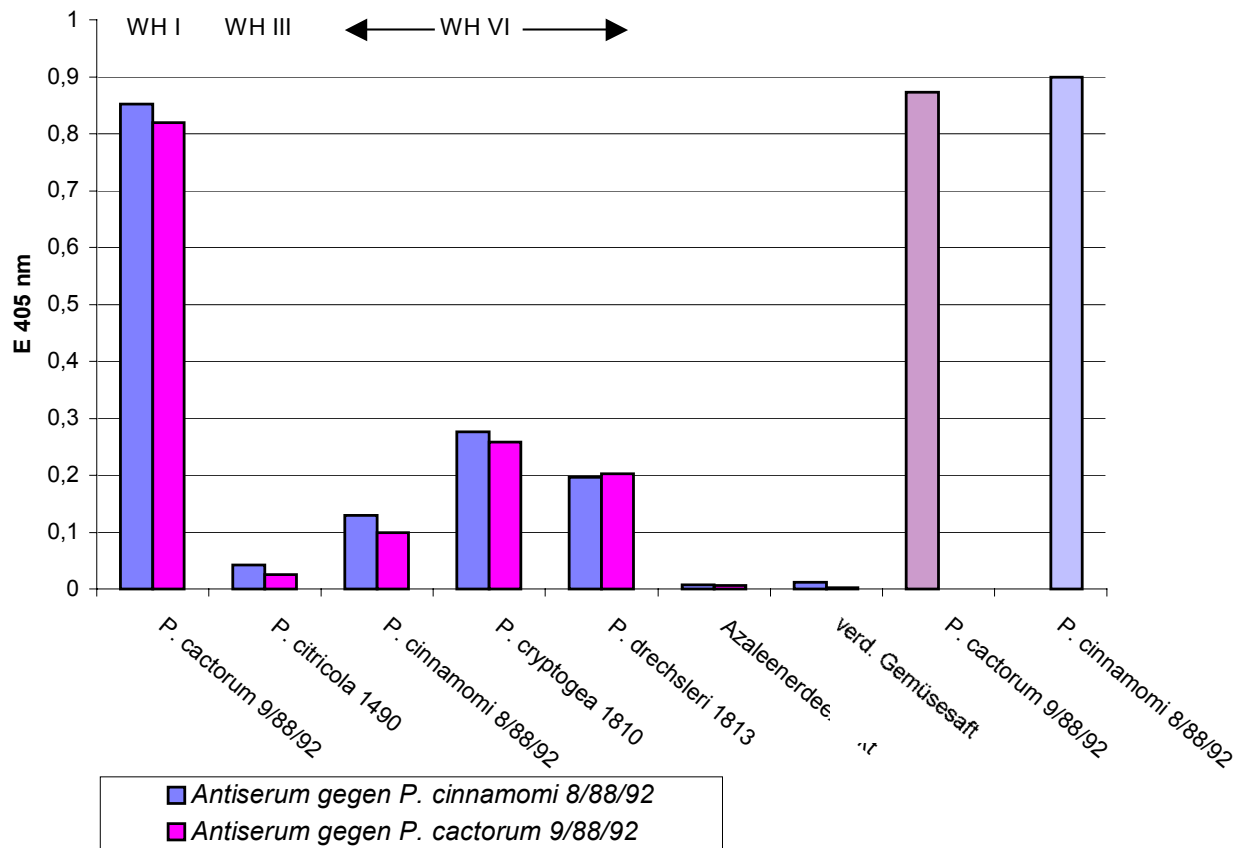


Abb. 17: Extinktionswerte (E_{405nm}) der polyklonalen Antiseren mit jeweils 1.000 Zoosporen pro ml (eine Zoospore pro μ l) verschiedener *Phytophthora*-Arten im DAS-ELISA (WH = Einteilung nach STAMPS *et al.* 1990)

3.1.1.2 Sensitivität der polyklonalen Antiseren

Beide Antiseren reagierten mit den Zoosporen desjenigen Isolates, gegen dessen Strukturen sie hergestellt worden waren. Sie unterschieden sich aber deutlich voneinander in ihrer Empfindlichkeit gegenüber den eingesetzten Zoosporen Mengen (Abb. 18).

Abnehmende Zoosporenkonzentrationen führten bei beiden Seren zu sinkenden Extinktionswerten im DAS-ELISA (Abb. 18). Diese Abnahme der Extinktionswerte verlief jedoch bei beiden Antiseren nicht linear, das heißt, mit einer Halbierung der eingesetzten Zoosporenkonzentration z.B. von 10.000 auf 5.000 Zoosporen pro ml ging mit keinem der Antiseren eine Halbierung der Extinktionswerte einher.

Alle verwendeten Konzentrationen von zehn bis 100.000 *P. cactorum*-Zoosporen pro ml führten mit dem Antiserum gegen *P. cactorum* 9/88/92 zu positiven ELISA-Reaktionen (siehe 2.5.2), also Extinktionswerten oberhalb von 0,15 E_{405nm} (Abb. 18). So ergaben 100.000 Zoosporen einen Wert von 1,184 E_{405nm} , der damit höher war als derjenige der aufgearbeiteten Strukturen aus Flüssigkultur, die als Positivkontrollen dienten. Die Extinktionswerte sanken

beim Einsatz geringerer Zoosporenkonzentrationen. Gleichwohl ergaben noch 100 Zoosporen pro ml (eine Zoospore pro 10 μ l, siehe 2.5.1, Tab. 8) einen Extinktionswert von 0,617 $E_{405\text{nm}}$ und zehn Zoosporen (eine Zoospore pro 100 μ l) 0,18 $E_{405\text{nm}}$ und damit Werte deutlich oberhalb des Schwellenwertes für eine positive ELISA-Reaktion.

Das gegen Strukturen von *P. cinnamomi* 8/88/92 produzierte Antiserum erwies sich als weit- aus weniger empfindlich gegenüber den Zoosporen desselben Isolates (Abb.18). So verursachten nur zwei der geprüften Zoosporenkonzentrationen - 100.000 pro ml und 50.000 pro ml - eine positive ELISA-Reaktion. Die Extinktionswerte waren dabei um mehr als die Hälfte geringer als die entsprechende Positivkontrolle. Bereits bei 10.000 Zoosporen pro ml (eine Zoospore pro 10 nl) lag der Extinktionswert im ELISA im Bereich der sogenannten Grauzone zwischen 0,1 und 0,15 $E_{405\text{nm}}$ (siehe 2.3.2) und ergab damit keine eindeutig positive Reaktion.

Die jeweils mitgeführten Medien, in denen die Zoosporeninduktion stattfand, reagierten nicht mit den verwendeten Antiseren im ELISA (Abb. 18).

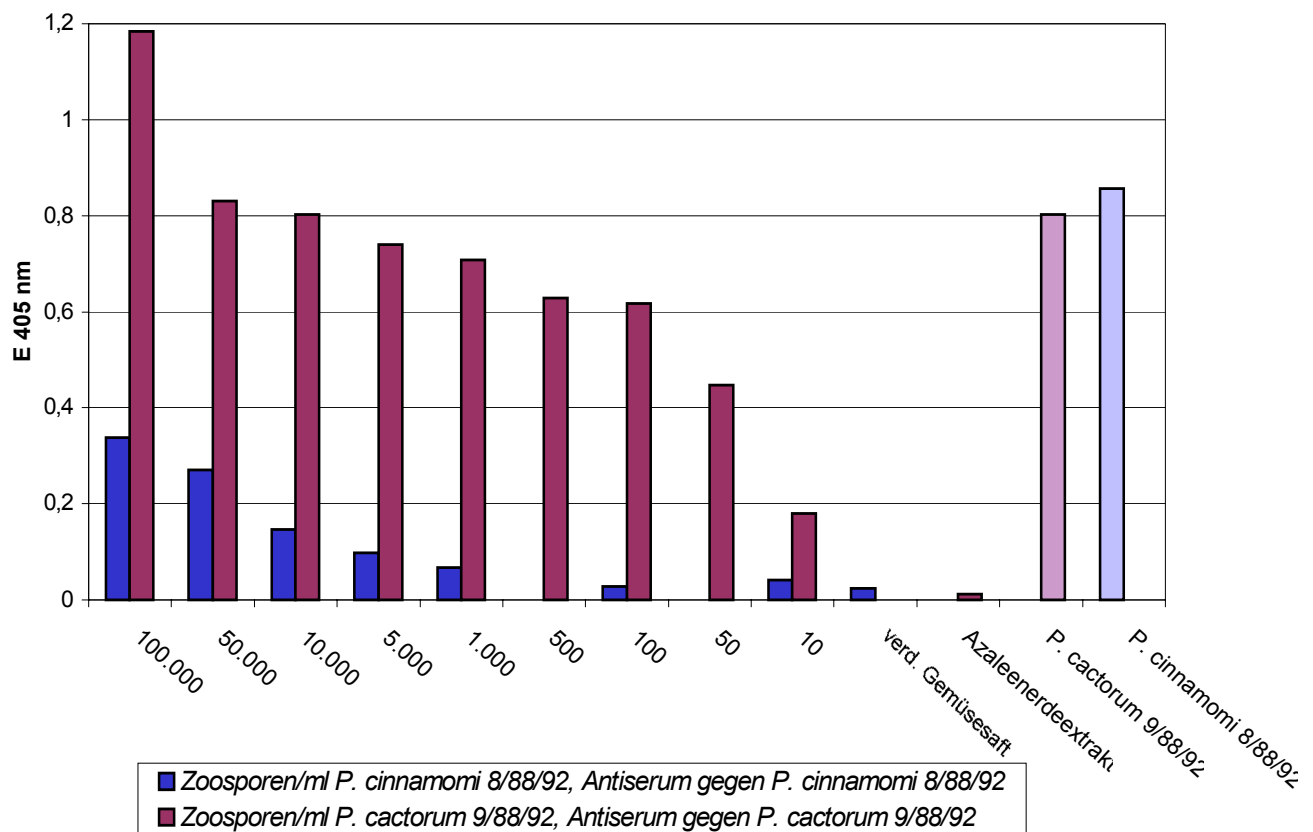


Abb. 18: Extinktionswerte ($E_{405\text{nm}}$) der polyklonalen Antiseren mit unterschiedlichen Zoosporen- mengen von *P. cinnamomi* 8/88/92 und *P. cactorum* 9/88/92 im DAS-ELISA

3.1.2 Mikrobiologische Verfahren

- Spezifität verschiedener Selektivmedien

Als Vergleich zu den ausgewählten Selektivmedien dienten die zur Kultivierung von *Phytophthora*-Arten international gebräuchlichen Medien CM, MS und GS ohne jegliche Zusätze. Das durchschnittliche vegetative Wachstum betrug für die ausgewählten *Phytophthora*-Arten zwischen 4,0 mm und 8,85 mm pro Tag auf GS, sowie zwischen 4,35 mm und 7,65 mm pro Tag auf MS und zwischen 4,15 mm und 6,95 mm pro Tag auf CM (siehe 2.3.1). *P. cryptogea* und *P. cinnamomi* wuchsen auf diesen Medien in etwa gleich schnell, während *P. citricola* und *P. drechsleri* auf dem GS eine deutlich höhere Wachstumsrate gegenüber den beiden anderen Medien aufwiesen. Das Isolat von *P. cactorum* hingegen wuchs auf CM und GS langsamer als auf MS (Tab.11).

Die Medien, deren Grundbestandteil CM und denen Hymexazol zugesetzt worden war, (CM+H und PARP) übten einen besonders großen Einfluss aus. Auf diesen beiden Medien war die Wachstumsrate aller geprüften *Phytophthora*-Isolate im Vergleich zu den Medien ohne Zusätze erheblich reduziert. Sie betrug nur zwischen 0,7 mm und 5,85 mm für das CM+H Medium. Das geringste vegetative Wachstum wurde unabhängig von der untersuchten Art auf dem PARP Medium verzeichnet, es lag nur zwischen 0 mm und 1,05 mm pro Tag. Durch das 3P-Medium hingegen blieb das Wachstum der Isolate weitestgehend unbeeinflusst (Tab.11).

Unterschiede in den Wachstumsraten ergaben sich auch bei den Selektivmedien, die auf dem Gemüsesaft basierten. Während bei *P. cryptogea*, *P. cactorum* und *P. cinnamomi* die durchschnittlichen Wachstumsraten in etwa denjenigen auf GS entsprachen, bzw. z.T. sogar geringfügig etwas höher lagen, so waren sie bei *P. drechsleri* deutlich geringer und bei *P. citricola* sogar erheblich reduziert (Tab.11).

Besonders empfindlich auf das PARP Medium reagierten die beiden Isolate *P. cactorum* und *P. citricola* aus den WATERHOUSE-Gruppen I und III, verglichen mit den übrigen *Phytophthora*-Arten, die alle aus der WATERHOUSE-Gruppe VI stammten. *P. cactorum* 9/88/92 zeigte auf diesem Medium kein Wachstum und bei *P. citricola* 1490 betrug die durchschnittliche Wachstumsrate 0,15 mm, während es bei den übrigen *Phytophthora*-Arten mindestens 0,7 mm waren (Tab.11).

Das Isolat von *P. cactorum* erwies sich als von allen untersuchten Isolaten am empfindlichsten, da auch dessen Wachstumsrate auf CM+H gegenüber dem Medium ohne Zusatz (CM), verglichen mit den anderen untersuchten Arten, am deutlichsten reduziert war. Dasjenige Selektivmedium, auf dem diese *Phytophthora*-Art die höchste Wachstumsrate aufwies (5,05 mm pro Tag), war NVP (Tab.11). Es eignete sich daher für die ausgewählten *Phytophthora*-Arten am besten und wurde im folgenden in den mikrobiologischen Untersuchungsmethoden eingesetzt.

Tabelle 11: Durchschnittliche Wachstumsraten verschiedener *Phytophthora*-Arten auf Nähr- (MS, GS, CM) und Selektivmedien (CM+H, 3P, PARP, NVP, PVAP, BNRH)

Medium ¹⁾	Durchschnittliche Wachstumsrate (mm/24 Std; n = 20) von <i>Phytophthora</i> -Arten				
	<i>P. cactorum</i> 9/88/92 WH I ²⁾	<i>P. citricola</i> 1490 WH III ²⁾	<i>P. cinnamomi</i> 8/88/92 WH VI ²⁾	<i>P. cryptogea</i> 1810 WH VI ²⁾	<i>P. drechsleri</i> 1813 WH VI ²⁾
MS	6,40	4,55	7,65	7,65	4,35
CM	4,15	4,30	6,75	6,95	4,80
GS	4,0	8,85	6,40	7,50	7,50
CM+H	0,70	3,35	4,60	5,85	3,40
3P	3,20	3,75	6,85	6,80	4,75
PARP	0	0,15	1,05	0,70	0,85
NVP	5,05	4,60	7,30	7,40	4,95
PVAP	3,85	4,40	6,85	6,95	4,85
BNRH	4,60	5,90	5,85	7,50	4,20

¹⁾ Medienabkürzungen und -bestandteile (Mengenangaben siehe 2.2, Tab. 3):

MS = Möhrensaft-Agar

CM = Corn Meal-Agar

GS = Gemüsesaft-Agar

CM+H = CM plus Hymexazol

3P = CM plus Pimaricin, Polymyxin, Penicillin

PARP = CM plus Pimaricin, Ampicillin, Rifampicin, Pentachlornitrobenzol, Hymexazol

NVP = Gemüsesaft-Agar (GS) plus Nystatin, Vancomycin, Pentachlornitrobenzol

PVAP = GS plus Pimaricin, Vancomycin, Ampicillin, Pentachlornitrobenzol

BNRH = GS plus Benomyl, Nystatin, Rifamycin, Hymexazol

²⁾ WH = Einteilung der *Phytophthora*-Arten nach STAMPS *et al.* 1990

3.1.3 Köderverfahren

3.1.3.1 Spezifität der Köder

- Strukturen auf festem Nährmedium

Alle drei verwendeten Köder (siehe 2.5.4) erfassten die auf dem festen Nährmedium gebildeten Strukturen (siehe 2.3.1, Tab. 4) der untersuchten *Phytophthora*-Arten (Tab.12 a).

Je nach Köder waren jedoch die Zahl verbräunter Inokulationspunkte an den Äpfeln, die Zahl der Lupinensämlinge mit verbräunten Hauptwurzelspitzen und die der Rhododendronblätter mit den typischen Flecken, sowie die Reisolierungsrate aus den Ködern bei den untersuchten Isolaten von *P. cinnamomi*, *P. cactorum*, *P. citricola*, *P. cryptogea* und *P. drechsleri* unterschiedlich.

Beim Apfeltest lag die Zahl der Inokulationspunkte mit Symptomen in Abhängigkeit von der untersuchten *Phytophthora*-Art zwischen 75 % für *P. cryptogea* und *P. cinnamomi* und 100 % für die Isolate von *P. cactorum* und *P. citricola*. Die Reisolierungsraten aus dem verbräunten Apfelgewebe waren ebenfalls von der geködeten *Phytophthora*-Art abhängig. Zu jeweils 100 % gelang die Reisolierung der Isolate *P. cactorum* bzw. *P. citricola*, während sie bei *P. cinnamomi* 8/88/92 nur in der Hälfte der ausgelegten Gewebestückchen erfolgreich war (Tab. 12 a).

Im Lupinentest war der Anteil Sämlinge mit verbräunten Hauptwurzelspitzen am geringsten für das Isolat *P. drechsleri* 1813 (15 %) und am höchsten für das Isolat *P. cinnamomi* 8/88/92 (85 %). Auch die Reisolierungsrate aus den Wurzelspitzen variierte in Abhängigkeit von der untersuchten *Phytophthora*-Art. Am erfolgreichsten war die Reisolierung mit einer Rate von 95 % für *P. cactorum* 9/88/92 und von 85 % für *P. cinnamomi* 8/88/92, während sie für die übrigen Isolate lediglich zwischen 55 % (*P. drechsleri*) und 65 % (*P. citricola*) lag (Tab. 12 a).

Im Test mit den Rhododendronblättern hatten je nach *Phytophthora*-Art zwischen 60 % (*P. cryptogea* und *P. drechsleri*) und 90 % (*P. citricola*) der Blätter Symptome. Alle untersuchten Arten konnten zu 80 % (*P. drechsleri* 1813) und 100 % (*P. cactorum* 9/88/92, *P. cinnamomi* 8/88/92, *P. cryptogea* 1810) aus den Blättern reisoliert werden (Tab. 12 a).

Demnach war die Anzahl an Ködern mit Symptomen im Apfeltest im Durchschnitt am höchsten. Der Anteil der Rhododendronblätter im Test, die die typischen Symptome aufwiesen, war etwas geringer, aber durchschnittlich höher als bei den Sämlingen im Lupinentest. Die Zahl verursachter Symptome an den Ködern und die Reisolierungsraten aus den Ködern hingen nicht von der jeweiligen WATERHOUSE-Gruppe der getesteten *Phytophthora*-Arten ab. Die höchsten Reisolierungsraten von allen drei Ködern zeigten die Rhododendronblätter. Dieses Verfahren war insgesamt am erfolgreichsten was das Ködern der geprüften *Phytophthora*-Strukturen auf festen Nährmedien anbetraf.

Die Kontrollen der Äpfel und Rhododendronblätter blieben symptomlos, nur bei der Kontrollvariante der Lupinen traten in 15 % der untersuchten Sämlinge verbräunte Hauptwurzelspitzen auf. Aus diesen und aus allen anderen Kontrollen wurde aber keine *Phytophthora*-Art isoliert (Tab. 12 a).

- Zoosporen

Alle drei Köder erfassten auch Zoosporen (siehe 2.3.3 und 2.5.1), allerdings im Gegensatz zu den Strukturen auf festen Medien nicht von allen untersuchten *Phytophthora*-Arten (Tab. 12 b). Verwendet wurde die höchste Zoosporenkonzentration, die gleichzeitig mit allen fünf getesteten Isolaten erzielt werden konnte, nämlich 5.000 Zoosporen pro Testansatz.

Im Apfeltest verursachte die eingesetzte Zoosporenmenge (5.000 Zoosporen pro Testansatz = eine Zoospore pro 0,05 μ l) der Isolate von *P. cactorum*, *P. citricola* und *P. cinnamomi* an allen Inokulationspunkten Symptome. Die Reisolierung aus den Äpfeln war unabhängig von der *Phytophthora*-Art und gelang zu jeweils 100 % (Tab. 12 b).

Der Lupinentest erfasste nur die eingesetzten Zoosporenmengen (5.000 Zoosporen pro Testansatz = eine Zoospore pro 500 μ l) der Isolate *P. citricola*, *P. cryptogea* und *P. cinnamomi*: zwischen 70 % und 100 % der Sämlingswurzeln waren verbräunt und die Reisolierungsraten lagen zwischen 55 % und 80 %. Die verwendete Zoosporenkonzentration der Isolate *P. drechsleri* und *P. cactorum* dagegen verursachte nur 10 % bzw. gar keine Symptome an den Lupinen und diese *Phytophthora*-Arten konnten nicht reisoliert werden (Tab. 12 b).

Im Rhododendronblatt-Test schwankte der Anteil an Blättern mit Symptomen zwischen 10 % für Zoosporen (5.000 Zoosporen pro Testansatz = eine Zoospore pro 500 μ l) von *P. cactorum* 9/88/92 und 90 % für diejenigen von *P. citricola* 1490. Die *Phytophthora*-Art *P. citricola* konnte zu 100 % aus den Blättern reisoliert werden, das Isolat *P. cactorum* dagegen hatte von allen untersuchten *Phytophthora*-Arten die geringste Reisolierungsrate, nämlich 10 % (Tab. 12 b).

Der Apfeltest erfasste unabhängig von der jeweiligen WATERHOUSE-Gruppe die Zoosporenmenge aller getesteten *Phytophthora*-Arten. Lupinen- und Rhododendronblatt-Test erwiesen sich als weitestgehend unempfindlich gegenüber der eingesetzten Zoosporenmenge von *P. cactorum*, aber besonders empfindlich gegenüber denjenigen von *P. citricola*. Mit dem Lupinentest gelang es außerdem nicht, die eingesetzte Zoosporenmenge von *P. drechsleri* 1813 zu ködern (Tab. 12 b).

In allen Fällen blieben die Kontrollen symptomlos und ohne Reisolierung (Tab. 12 b).

3.1.3.2 Sensitivität der Köder

Alle drei Köder erfassten die Zoosporen der Isolate *P. cinnamomi* 8/88/92 und *P. cactorum* 9/88/92, unterschieden sich aber in ihrer Empfindlichkeit gegenüber den beiden untersuchten *Phytophthora*-Arten und den unterschiedlichen Zoosporenkonzentrationen (siehe 2.5.1). Mit Abnahme der eingesetzten Zoosporenmenge nahmen auch die Zahl der Symptome an den Ködern und die Reisolierungsraten ab (Tab. 12 c).

Im Apfeltest verursachten die beiden höchsten Zoosporenkonzentrationen (10^4 = eine Zoospore pro 0,01 μ l und 10^3 = eine Zoospore pro 0,1 μ l) bei beiden *Phytophthora*-Arten eine 100 % ige Symptomausprägung und Reisolierungsrate. Der Apfeltest erwies sich als besonders sensibel gegenüber den Zoosporen von *P. cactorum*: die Menge von nur zehn Zoosporen (eine Zoospore pro 10 μ l) dieses Isolates verursachte noch an 50 % der Inokulations-

stellen Symptome, aus denen die Reisolierung zu 100 % erfolgreich war. Die Nachweisgrenze für Zoosporen von *P. cinnamomi* lag um eine Zehnerpotenz höher, bei 100 Zoosporen pro Inokulationspunkt (eine Zoospore pro μl) (Tab. 12 c).

Im Lupinentest verursachte nur die höchste eingesetzte Zoosporenkonzentration (10^5 pro 1.000 ml = eine Zoospore pro 10 μl) von *P. cactorum*-Zoosporen an 25 % der Sämlinge Symptome, aus denen die *Phytophthora*-Art zu 60 % reisoliert werden konnte. Obwohl auch bei niedrigeren Zoosporenkonzentrationen dieses Isolates noch Symptome auftraten, war die Reisolierung nicht erfolgreich. Die Zahl der Sämlinge mit Symptomen und auch die Reisolierungsrate war bei den Zoosporenkonzentrationen von *P. cinnamomi* dagegen höher als bei *P. cactorum*. Es gelang, mit den Sämlingen noch 10^3 Zoosporen (eine Zoospore pro 1 ml) zu ködern (Tab. 12 c).

Der Rhododendronblatt-Test erwies sich ebenfalls empfindlicher gegenüber den Zoosporenmengen von *P. cinnamomi* 8/88/92 als von *P. cactorum* 9/88/92. Während nur die höchste Zoosporenkonzentration (10^5 pro 1.000 ml = eine Zoospore pro 10 μl) von *P. cactorum* an den Blättern Flecken verursachte, konnten bei derselben Konzentration von *P. cinnamomi* an allen Blättern Symptome festgestellt werden. Einer Reisolierungsrate von 28 % für *P. cactorum*-Zoosporen stand eine von 97 % für *P. cinnamomi* gegenüber. Noch 10^3 *P. cinnamomi*-Zoosporen (eine Zoospore pro 1 ml) verursachten an 60 % der Blätter typische Flecken, aus denen die *Phytophthora*-Art zu 53 % reisoliert werden konnte. Auch bei niedrigeren Zoosporenkonzentrationen dieses Isolats wurden noch Symptome bonitiert, eine Reisolierung war aber nicht erfolgreich (Tab. 12 c).

Alle drei Köder hatten in Abhängigkeit von der untersuchten *Phytophthora*-Art unterschiedliche Nachweisgrenzen für Zoosporen. Während es mit den Ködern Lupine und Rhododendronblatt gelang, noch eine Zoospore von *P. cinnamomi* pro 1.000 μl nachzuweisen, lag die Nachweisgrenze mit dem Apfel 1.000 mal höher, nämlich nur bei einer Zoospore pro 1 μl dieses Isolats. Gegenüber den Zoosporen von *P. cactorum* waren alle Köder gleich empfindlich – die Nachweisgrenze lag bei einer Zoospore pro 10 μl . (Tab. 12 c).

Aus den Kontrollen konnte - obwohl ein Teil der Rhododendronblätter Verfärbungen aufwies - in keinem Fall *Phytophthora* spp. isoliert werden (Tab. 12 c).

Tabelle 12 a-c * : Symptomentwicklung und Reisolierungsraten in Köderverfahren

a) mit Strukturen auf festen Nährmedien verschiedener *Phytophthora*-Arten
(Inokula siehe 2.5.1, Tab. 8)

Phytophthora-Art	Köder					
	Apfel		Lupinensämling		Rhododendronblatt	
	$n_{1s} = 12$	$n_{1r} = 48$	$n_{2s} = 20$	$n_{2r} = 40$	$n_{3s} = 10$	$n_{3r} = 30$
	s_1 (%)	r (%)	s_2 (%)	r (%)	s_3 (%)	r (%)
<i>P. cactorum</i> 9/88/92 WH I ¹⁾	100	100	70	95	80	100
<i>P. citricola</i> 1490 WH III ¹⁾	92	100	45	65	90	90
<i>P. cinnamomi</i> 8/88/92 WH VI ¹⁾	75	50	85	85	80	100
<i>P. cryptogea</i> 1810 WH VI ¹⁾	75	75	45	60	60	100
<i>P. drechsleri</i> 1813 WH VI ¹⁾	83	92	15	55	60	80
Nicht inokuliert	0	0	15	0	0	0

b) mit Zoosporen verschiedener *Phytophthora*-Arten

(Inokula, siehe 2.5.1, Tab. 8: Äpfel: 5000 Zoosporen pro Inokulationspunkt = pro 100 µl; Lupinensämlinge und Rhododendronblätter: 5000 Zoosporen pro Testansatz = fünf Zoosporen pro ml)

Phytophthora-Art	Köder					
	Apfel		Lupinensämling		Rhododendronblatt	
	$n_{1s} = 12$	$n_{1r} = 48$	$n_{2s} = 20$	$n_{2r} = 40$	$n_{3s} = 10$	$n_{3r} = 30$
	s_1 (%)	r (%)	s_2 (%)	r (%)	s_3 (%)	r (%)
<i>P. cactorum</i> 9/88/92 WH I ¹⁾	100	100	0	0	10	10
<i>P. citricola</i> 1490 WH III ¹⁾	100	100	100	80	90	100
<i>P. cinnamomi</i> 8/88/92 WH VI ¹⁾	100	100	70	65	80	80
<i>P. cryptogea</i> 1810 WH VI ¹⁾	75	100	70	55	30	55
<i>P. drechsleri</i> 1813 WH VI ¹⁾	67	100	10	0	60	40
Nicht inokuliert	0	0	0	0	0	0

c) mit unterschiedlichen Zoosporenmengen von *P. cactorum* 9/88/92 und *P. cinnamomi* 8/88/92

(Inokula, siehe 2.5.1 Tab. 8; Äpfel: Zoosporen pro Testansatz = Zoosporen pro Inokulationspunkt = Zoosporen pro 100 µl; Lupinensämlinge und Rhododendronblätter: Zoosporen pro Testansatz = Zoosporen pro 1000 ml)

Zoosporen pro Testansatz	Apfel		Köder				Lupinensämling		Rhododendronblatt			
	$n_{1s} = 12$		$n_{1r} = 48$		$n_{2s} = 20$		$n_{2r} = 40$		$n_{3s} = 10$ $n_{3r} = 30$			
	<i>P. cactorum</i> s_1 (%)	r (%)	<i>P. cinnamomi</i> s_1 (%)	r (%)	<i>P. cactorum</i> s_2 (%)	r (%)	<i>P. cinnamomi</i> s_2 (%)	r (%)	<i>P. cactorum</i> s_3 (%)	r (%)		
10^5	—	—	—	—	25	60	95	70	27	28	100	97
10^4	100	100	100	100	20	0	65	85	0	0	80	93
10^3	100	100	100	100	5	0	30	5	0	0	60	53
10^2	100	100	50	100	0	0	0	0	0	0	40	0
10^1	50	100	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nicht inokuliert	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0

* Erläuterungen zu Tabelle 12 a-c:

¹⁾ WH = Einteilung der *Phytophthora*-Arten nach STAMPS et al. 1990

n_{1s} = Anzahl der Inokulationspunkte (drei Inokulationspunkte pro Apfel)

n_{1r} = Anzahl der ausgelegten Gewebestückchen (vier pro verbräuntem Inokulationspunkt)

n_{2s} = Anzahl der Wurzelspitzen (eine Wurzelspitze pro Lupinensämling)

n_{2r} = Anzahl der ausgelegten Wurzelstückchen (zwei pro Wurzelspitze)

n_{3s} = Anzahl der Rhododendronblätter

n_{3r} = Anzahl der ausgelegten Rhododendronblattstücke (drei Gewebestücke pro Blatt)

— = nicht durchgeführt

s_1 = Inokulationspunkte mit Verbräunungen

s_2 = Sämlinge mit verbräunten Wurzelspitzen

s_3 = Blätter mit typischen Flecken/Verbräunungen

r = Reisolierungsrate ausgelegter Gewebestückchen auf MSCH (siehe 2.2.1)

3.2 Nachweis von *Phytophthora*-Arten unter Praxisbedingungen

Unter Praxisbedingungen sollte dasjenige Verfahren ermittelt werden, das am zuverlässigsten *Phytophthora* spp. nachweist und sich damit als robust genug für den Einsatz in den Baumschulen herausstellt. Denn Praxisproben unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung von den künstlich hergestellten Proben, mit denen die Verfahren zuvor unter kontrollierten Bedingungen geprüft worden waren. Die Wasser- und Sedimentproben aus den Betrieben variieren beispielsweise mit der Baumschule, dem Ort der Probenahme und der Jahreszeit. Zu erwarten sind z.B. pH-Wert Schwankungen, unterschiedliche Nährstoffgehalte und Pflanzenschutzmittelrückstände, sowie Pflanzenreste in den Proben. Ein geeignetes Verfahren für den Praxisgebrauch sollte davon in seiner Aussage weitestgehend unbeeinflusst bleiben und in der Lage sein auch unter Praxisbedingungen ein möglichst breites Artenspektrum zu detektieren.

3.2.1 Serologisches Verfahren DAS-ELISA

Mit dem DAS-ELISA konnte in allen untersuchten Betrieben *Phytophthora* spp. nachgewiesen werden. Dabei wurde in der jungen Baumschule Nr. 1 die geringste Zahl an positiven Proben mit dem Testverfahren angezeigt. In den übrigen Betrieben mit älteren Anlagen lag der prozentuale Anteil von Proben mit *Phytophthora* spp. zwischen 27,4 und 40,9 %. (Tab. 13 a).

Die Erreger wurden mit dem Verfahren unabhängig vom Probenmaterial sowohl in den aufgearbeiteten Sedimenten, als auch in den Wasserproben nachgewiesen. In den Wasserproben war die Nachweisrate mit 37,8 % höher, als in den untersuchten Sedimentproben (Tab. 13 b).

Mit dem DAS-ELISA gelang der Nachweis von *Phytophthora* spp. zu jedem der Probenahmezeitpunkte, die Nachweisrate hing allerdings stark vom jeweiligen Untersuchungszeitpunkt ab. So konnten in den Monaten Oktober, November, Februar und März in 33,3 bis 58,8 % aller Proben die Erreger detektiert werden, in den Sommermonaten dagegen nur bis maximal 19 %. In den Monaten August und Juli wurde sogar in nur einer einzigen Probe ein Wert oberhalb des festgelegten Schwellenwertes für eine positive ELISA-Reaktion gemessen und damit *Phytophthora* spp. nachgewiesen (Tab. 13 c).

Der Nachweis mit dem ELISA hing auch vom Probenahmeort ab. Die Erreger wurden sowohl in den Teichen, als auch in den Abläufen nachgewiesen, aber in keinem einzigen der beprobten Brunnen. Mit jeweils einer Ausnahme, in der kein Nachweis erfolgte, zeigte der DAS-ELISA in jedem der beprobten Abläufe und Teiche *Phytophthora* spp. an. Die Zahl der Nachweise betrug bei den Abläufen mindestens 28,6 % und maximal 71,4 %. Die Zahl der positiven Proben, die aus Teichen stammten, schwankte zwischen 14,3 % für das Wasser aus Betrieb Nr. 2 und 66,7 % für das Wasser aus Betrieb Nr. 4 (Tab. 13 d).

- Vergleich der polyklonalen Antiseren

Beide Antiseren wiesen in jedem der beprobten Betriebe *Phytophthora* spp. nach. Die Zahl der Extinktionswerte oberhalb des Schwellenwertes für eine positive ELISA-Reaktion und damit positiver Proben war mit dem Antiserum gegen *P. cinnamomi* in jedem der Betriebe um mehr als das Doppelte höher als mit dem Antiserum gegen *P. cactorum* (Tab. 13 a).

Mit beiden Antiseren erfolgte der Nachweis sowohl in Wasser-, als auch in Sedimentproben. Allerdings lag der Anteil an Wasserproben, in denen mit dem Antiserum gegen *P. cactorum* *Phytophthora* spp. nachgewiesen wurde, bei nur einem Fünftel dessen, was mit dem gegen *P. cinnamomi* hergestellten Antiserum nachgewiesen wurde (Tab. 13 b).

Während *Phytophthora* spp. mit dem Antiserum gegen *P. cinnamomi* unabhängig vom Probenahmeterrain nachgewiesen werden konnten, gelang mit dem Antiserum gegen *P. cactorum* nicht an allen Terminen ein Nachweis. Nur zu zwei Terminen im August und Februar wurden mit dem Antiserum gegen *P. cactorum* in annähernd gleich vielen Proben *Phytophthora* spp. nachgewiesen wie mit dem Antiserum gegen *P. cinnamomi*, ansonsten lag die Zahl der Nachweise weitaus darunter. An vier der sieben Beprobungstermine wurden die Erreger sogar in jeweils nur einer einzigen der untersuchten Proben mit dem gegen *P. cactorum* hergestellten Antiserum detektiert (Tab. 13 c).

Mit beiden Antiseren war es möglich, in Abläufen und Teichen, nicht aber in Brunnen *Phytophthora* spp. nachzuweisen. Das Antiserum gegen *P. cactorum* wies im Vergleich zu dem Antiserum gegen *P. cinnamomi* in einem weitaus geringeren Teil der Proben aus Abläufen und Teichen *Phytophthora* spp. nach. Dies war besonders bei den Proben aus Teichen der Fall. Von den hier untersuchten neun Probenahmeorten wurden die Erreger mit dem Antiserum gegen *P. cactorum* nur an drei Orten detektiert (Tab. 13 d).

Bei dem Vergleich der beiden verwendeten Antiseren erwies sich das gegen *P. cinnamomi* 8/88/92 gerichtete Antiserum weitaus empfindlicher als dasjenige gegen *P. cactorum* 9/88/92, da mit ihm in wesentlich mehr Proben *Phytophthora* spp. nachgewiesen wurde (Tab. 13 a). Die Wertemenge beider Antiseren, die unterhalb des Schwellenwertes von $E_{405\text{nm}} = 0,15$ und oberhalb des Schwellenwertes von $E_{405\text{nm}} = 0,1$ - also im Grenzbereich zwischen positiver und negativer ELISA-Reaktion - lag und damit keine eindeutige Aussage zum Nachweis zuließ, war annähernd gleich (Tab. 14).

Nahezu alle Proben, die bei Verwendung des Antiserums gegen *P. cactorum* im ELISA einen Extinktionswert oberhalb des Schwellenwertes von $E_{405\text{nm}} = 0,15$ erreichten und damit positiv waren, waren dies auch mit dem gegen *P. cinnamomi* gerichteten Antiserum. Einzige Ausnahme war die im Mai entnommene Probe (3b) aus einem der Abläufe in Baumschule Nr. 3, die nur mit dem gegen *P. cactorum* gerichteten Antiserum im ELISA positiv war (Tab. 13 d).

3.2.2 Mikrobiologische Verfahren

Mit den mikrobiologischen Techniken wurden nur in drei der vier beprobten Betriebe *Phytophthora*-Arten isoliert. Während in der Baumschule Nr. 1 mit dem jüngsten Anlagen zur Wiederverwendung von Überschusswasser kein einziger Nachweis gelang, betrug die Zahl der Proben, in denen *Phytophthora*-Arten nachgewiesen werden konnten in allen übrigen Betrieben mit älteren Anlagen mindestens 21,6 % (Tab. 15 a).

Der Nachweis von *Phytophthora*-Arten hing sehr deutlich vom Probenmaterial ab. Nur ein einziges Mal während des gesamten Probenahmezeitraumes gelang es mit der Methode, aus den Wasserproben *Phytophthora* spp. zu isolieren. In den Sedimentproben dagegen wurden weitaus häufiger die Erreger detektiert – in 38,7 % aller untersuchten Proben (Tab. 15 b).

Der Isolierungserfolg der *Phytophthora*-Arten mit den mikrobiologischen Methoden war ebenfalls abhängig vom Probenahmezeitpunkt. Weder im August, noch im Oktober konnten in den Proben die Erreger detektiert werden. Am häufigsten während des gesamten Probenahmezeitraumes gelang der Nachweis mit einer der Methoden zum Wintertermin im Februar, aus 43,7 % der Proben wurde *Phytophthora* spp. isoliert (Tab. 15 c).

Der Nachweis wurde durch den Ort der Probenahme beeinflusst. In keinem der vier Brunnen wurde *Phytophthora* spp. detektiert, dagegen mehrfach in Abläufen und Teichen. Während die Isolierung mit Ausnahme der beiden Abläufe 1a und 1b an allen Abläufen erfolgreich war, gelang sie innerhalb der beprobten Teiche noch nicht einmal an der Hälfte der beprobten Orte. In den Teichsedimenten der Teiche 2, 3a und 4 war der Isolierungserfolg am größten. Nur ein einziges Mal dagegen wurde *Phytophthora* spp. aus dem Teichwasser isoliert (Tab. 15 d).

3.2.3 Köderverfahren

3.2.3.1 Apfeltest

Mit dem Apfeltest gelang der Nachweis von *Phytophthora* spp. in jedem der beprobten Betriebe. Die Nachweishäufigkeit war aber vom Betrieb abhängig. So wurden *Phytophthora*-Arten innerhalb der Baumschule Nr. 1 nur ein einziges Mal mit Hilfe der Äpfel geködert, während sie in allen anderen Betrieben aus zwischen 15,6 und 27,3 % der Proben isoliert werden konnten (Tab. 16 a).

Unabhängig vom Probenmaterial köderten die Äpfel aus Wasser und Sediment *Phytophthora*-Arten. Die Nachweisrate aus Sediment war allerdings deutlich höher und betrug prozentual mehr als das Doppelte derjenigen aus den Wasserproben (Tab. 16 b).

Auf den Isolierungserfolg mit den Äpfeln hatte der Termin der Probenahme Einfluss, denn weder im August, noch im Oktober konnten aus den Proben *Phytophthora*-Arten isoliert werden, erst im November und ab diesem Zeitpunkt zu allen Terminen gelang der Nachweis von *Phytophthora* spp. Am Beprobungstermin im Juli wurden die Erreger am häufigsten isoliert – mit 38 % positiven Proben wurden zu diesem Termin im Sommer gegenüber allen anderen die meisten *Phytophthora* spp. isoliert (Tab. 16 c).

Der Ködererfolg mit den Äpfeln hing auch vom Probenahmeort ab. Aus den Brunnenwasserproben konnte entgegen den Abläufen und Teichen kein einziges *Phytophthora*-Isolat geködert werden. Mit nur einer Ausnahme (Ablauf 1a) wurden mit den Äpfeln aus jedem der beprobten Abläufe *Phytophthora*-Arten isoliert, allerdings an vier der sieben Abläufe nur zu einem einzigen Zeitpunkt. Die Zahl der Nachweise in den Teichproben war ebenfalls unterschiedlich – im Wasser von Teich 1 und in den Sedimenten der Teiche 3a und 3b konnte *Phytophthora* spp. nicht nachgewiesen werden, an den übrigen Orten wurden die Erreger zu einem oder zwei Zeitpunkten detektiert, am häufigsten aber (zu vier Zeitpunkten) im Sediment von Teich 4 (Tab. 16 d).

3.2.3.2 Lupinentest

Unabhängig von der Baumschule köderte der Lupinentest in jedem der Betriebe Vertreter aus der Gattung *Phytophthora*. Allerdings wurde in der jungen Baumschule Nr. 1 nur zu einem einzigen Zeitpunkt *Phytophthora* spp. nachgewiesen, in den übrigen Betrieben zu mehreren. Mit einer Nachweishäufigkeit von 32,3 % wurden die Erreger mit den Lupinensämlingen am häufigsten in Baumschule Nr. 2 geködert (Tab. 17 a).

Mit Hilfe der Lupinensämlinge konnte aus Wasser und aus Sediment *Phytophthora* spp. geködert werden. Bei der Mehrzahl der positiv getesteten Proben handelte es sich um Sedimentproben, die Nachweishäufigkeit war mit 29 % deutlich höher als die aus dem Wasser mit 7,6 % (Tab. 17 b).

Der Lupinentest erwies sich als unabhängig von den Beprobungsterminen – mit den Sämlingen gelang es zu jedem Zeitpunkt *Phytophthora*-Arten aus den Proben zu ködern. Der Isolierungserfolg war in den Monaten August und Februar mit Nachweisen in 27,3 % bzw. 31,3 % der Proben am größten, in den Monaten November und Mai mit jeweils 9,5 % am geringsten (Tab. 17 c).

Der Ort der Probenahme beeinflusste den Nachweis mit den Lupinen. Kein einziger Erreger aus der Gruppe der pilzähnlichen Mikroorganismen wurde in den Brunnen nachgewiesen, während *Phytophthora* spp. in den Teichen und Abläufen häufig geködert wurden. Dabei wurden mit 15 erfolgreichen Probenahmeterminen häufiger *Phytophthora* spp. in den Abläufen gefunden, als in den Teichen mit nur acht Terminen. Am häufigsten und fortwährend, nur mit Ausnahme des Beprobungstermins im Oktober, wurden *Phytophthora* spp. mit

Hilfe der Lupinen aus dem Ablauf 2a geködert - dies entsprach 85,7 % der Proben. Die Abläufe 1a und 3b blieben ohne Nachweis. Innerhalb der beprobten Orte der Teiche betrug der maximale Anteil Proben mit *Phytophthora* spp. 50 % (Teichsediment 4), an allen anderen Orten erfolgte mit den Lupinen entweder nur ein einziger oder gar kein Nachweis (Tab. 17 d).

3.2.3.3 Rhododendronblatt-Test

Der Rhododendronblatt-Test wies *Phytophthora* spp. in allen beprobten Baumschulen nach. Während aus dem Betrieb Nr. 1 der geringste Teil der Nachweise stammte (8,3 %), enthielten 68,1 bzw. 71 % der Proben aus den Betrieben Nr. 2 bzw. 4 *Phytophthora*-Arten (Tab. 18 a).

Ebenfalls unabhängig war das Testverfahren gegenüber dem Probenmaterial. Dennoch handelte es sich bei dem überwiegenden Teil der Proben, aus denen mit Hilfe der Blätter *Phytophthora* spp. isoliert werden konnte, nämlich 69,4 %, um Sedimentproben (Tab. 18 b).

Die Blätter köderten unabhängig vom Probenahmezeitpunkt über den gesamten Beprobungszeitraum hinweg *Phytophthora*-Arten. Zu jedem Termin konnten aus mindestens einem Drittel aller Proben *Phytophthora* spp. mit Hilfe der Blätter isoliert werden. Die Zahl der Proben, aus denen die Erreger geködert werden konnten, war in den Monaten August, Februar und März am höchsten und am niedrigsten im Mai und Juli (Tab. 18 c).

Abhängig war der Ködererfolg mit den Rhododendronblättern vom Probenahmeort. Das Verfahren wies an Abläufen und in Teichen *Phytophthora* spp. nach, nicht aber in den untersuchten Brunnen. Mit Ausnahme des Ablaufs 1a wurden die Erreger in allen Abläufen nachgewiesen. Aus den Abläufen 2a und 2b wurde sogar zu jedem Probenahmezeitpunkt mit Hilfe der Blätter *Phytophthora* spp. geködert – damit betrug die Nachweishäufigkeit 100 %. Mehr als 70 % der Proben aus den Abläufen 3a, 3c und 4 enthielten *Phytophthora*-Arten. Die Rhododendronblätter wiesen auch innerhalb der beprobten Teiche sehr häufig *Phytophthora* spp. nach. Ausnahmen waren das Teichwasser in Baumschule Nr. 1 und das Sediment aus Teich 3b, aus denen die Erreger nicht geködert wurden. In mindestens 42,9 % der Proben aller übrigen Orte wurde *Phytophthora* spp. nachgewiesen. Am häufigsten, wurde *Phytophthora* spp. im Teichwasser der Baumschule Nr. 2, 85,7 % der Proben waren positiv, geködert und im Sediment des Teichs der Baumschule Nr. 4, wo der Nachweis zu jedem Probenahmezeitpunkt erfolgte (Tab. 18 d).

Tabelle 13 a-d: Nachweis von *Phytophthora* spp. im ELISA mit den polyklonalen Antiseren (AS) gegen *P. cinnamomi* 8/88/92 (556) und *P. cactorum* 9/88/92 (557)

a) in Abhängigkeit vom Betrieb

Betrieb Nr.	n	Proben mit <i>Phytophthora</i> spp. ¹⁾ (%)		
		AS gegen <i>P. cinnamomi</i>	AS gegen <i>P. cactorum</i>	Insgesamt ²⁾
1	24	20,8	4,2	20,8
2	31	38,7	16,1	38,7
3	51	25,4	9,8	27,4
4	22	40,9	13,6	40,9

b) in Abhängigkeit vom Probenmaterial

Proben- material	n	Proben mit <i>Phytophthora</i> spp. ¹⁾ (%)		
		AS gegen <i>P. cinnamomi</i>	AS gegen <i>P. cactorum</i>	Insgesamt ²⁾
Wasser	66	37,9	7,5	37,9
Sediment	62	22,5	14,5	24,1

c) in Abhängigkeit vom Probenahmetermin (siehe 2.4.4, Tab.7)

Termin	n	Proben mit <i>Phytophthora</i> spp. ¹⁾ (%)		
		AS gegen <i>P. cinnamomi</i>	AS gegen <i>P. cactorum</i>	Insgesamt ²⁾
August	11	9,1	9,1	9,1
Oktober	21	42,8	4,8	47,6
November	21	33,3	14,2	33,3
Februar	16	50,0	43,8	50,0
März	17	58,8	5,9	58,8
Mai	21	14,2	4,8	19,0
Juli	21	4,8	0	4,8

¹⁾ Extinktionswerte ($E_{405\text{nm}}$) oberhalb des Schwellenwertes von $E_{405\text{nm}} = 0,15$ (siehe 2.5.2)²⁾ Prozentualer Anteil positiver Proben im ELISA mit beiden Antiseren (AS gegen *P. cinnamomi* und/oder AS gegen *P. cactorum*) von der Probengesamtzahl

d) in Abhängigkeit vom Probenahmeort

Probenahmeort ²⁾			n	Proben mit <i>Phytophthora</i> spp. ¹⁾ (%) und				Probenahmetermin ²⁾	
				AS gegen <i>P. cinnamomi</i>	AS gegen <i>P. cactorum</i>		Insgesamt ³⁾		
Brunnen	1	BW	4	0	0		0		
Brunnen	2	BW	4	0	0		0		
Brunnen	3	BW	4	0	0		0		
Brunnen	4	BW	4	0	0		0		
Ablauf	1a	AW	7	0	0		0		
Ablauf	1b	AW	6	50,0	Okt, Febr, März	16,7 Febr	50,0	Okt, Febr, März	
Ablauf	2a	AS	7	57,1	Okt, Nov, Febr, März	28,6 Febr, März	57,1	Okt, Nov, Febr, März	
Ablauf	2b	AS	6	66,7	Okt, Nov, Febr, März	16,7 Febr	66,7	Okt, Nov, Febr, März	
Ablauf	3a	AS	7	28,6	Nov, Febr	14,3 Febr	28,6	Nov, Febr	
Ablauf	3b	AS	7	14,3	März	14,3 Mai	28,6	März, Mai	
Ablauf	3c	AS	7	71,4	Aug, Okt, Nov, März, Juli	42,9 Aug, Okt, Nov	71,4	Aug, Okt, Nov, März, Juli	
Ablauf	4	AS	6	33,3	Nov, Mai	0	33,3	Nov, Mai	
Teich	1	TW	7	28,6	Okt, März	0	28,6	Okt, März	
Teich	2	TW	7	42,9	Okt, Nov, Febr	28,6 Nov, Febr	42,9	Okt, Nov, Febr	
Teich	2	TS	7	14,3	Okt	0	14,3	Okt	
Teich	3a	TW	7	28,6	Okt, März	0	28,6	Okt, März	
Teich	3a	TS	7	28,6	Febr, März	0	28,6	Febr, März	
Teich	3b	TW	6	0		0	0		
Teich	3b	TS	6	16,7	Mai	0	16,7	Mai	
Teich	4	TW	6	66,7	Okt, Nov, Febr, März	33,3 Nov, Febr	66,7	Okt, Nov, Febr, März	
Teich	4	TS	6	50,0	Febr, März, Mai	16,7 Febr	50,0	Febr, März, Mai	

¹⁾ Extinktionswerte (E_{405nm}) oberhalb des Schwellenwertes von $E_{405nm} = 0,15$ (siehe 2.5.2)

²⁾ Abkürzungen siehe 2.4.3, Tab. 6 und 2.4.4, Tab. 7; n = Zahl untersuchter Proben

³⁾ Prozentualer Anteil positiver Proben im ELISA mit beiden Antiseren (AS gegen *P. cinnamomi* und/oder AS gegen *P. cactorum*) von der Probengesamtzahl

Tabelle 14: Zahl nicht eindeutiger Nachweise von *Phytophthora* spp. mit den polyklonalen Antiseren (AS) gegen *P. cinnamomi* 8/88/92 (556) und gegen *P. cactorum* 9/88/92 (557)

n	Proben im Bereich der Grauzone ¹⁾ (%)	
	AS gegen <i>P. cinnamomi</i>	AS gegen <i>P. cactorum</i>
128	15,6	11,7

¹⁾ Zahl der Extinktionswerte im ELISA (E_{405nm}) im Bereich der sog. Grauzone zwischen den Schwellenwerten: $0,1 < E_{405nm} < 0,15$ (siehe 2.5.2); n = Zahl untersuchter Proben

Tabelle 15 a-d: Nachweis von *Phytophthora* spp. mit mikrobiologischen Verfahren

a) in Abhängigkeit vom Betrieb

Betrieb Nr.	n	Proben mit <i>Phytophthora</i> spp. (%)
1	24	0
2	31	29,0
3	51	21,6
4	22	22,7

b) in Abhängigkeit vom Probenmaterial

Probenmaterial	n	Proben mit <i>Phytophthora</i> spp. (%)
Wasser	66	1,5
Sediment	62	38,7

c) in Abhängigkeit vom Probenahmetermin (siehe 2.4.4, Tab.7)

Termin	n	Proben mit <i>Phytophthora</i> spp. (%)
August	11	0
Oktober	21	0
November	21	23,8
Februar	16	43,7
März	17	17,6
Mai	21	19,0
Juli	21	28,6

d) in Abhängigkeit vom Probenahmeort

Probenahmeort ¹⁾	n	Proben mit <i>Phytophthora</i> spp. (%) und Probenahmetermin ¹⁾
Brunnen 1 BW	4	0
Brunnen 2 BW	4	0
Brunnen 3 BW	4	0
Brunnen 4 BW	4	0
Ablauf 1a AW	7	0
Ablauf 1b AW	6	0
Ablauf 2a AS	7	42,9 Nov, Mai, Juli
Ablauf 2b AS	6	33,3 Febr, Juli
Ablauf 3a AS	7	28,6 Nov, Febr
Ablauf 3b AS	7	14,3 Febr
Ablauf 3c AS	7	57,1 Nov, Febr, März, Mai
Ablauf 4 AS	6	16,7 Juli
Teich 1 TW	7	0
Teich 2 TW	7	0
Teich 2 TS	7	57,1 Febr, März, Mai Juli
Teich 3a TW	7	0
Teich 3a TS	7	42,9 Febr, März, Juli
Teich 3b TW	6	16,7 Nov
Teich 3b TS	6	0
Teich 4 TW	6	0
Teich 4 TS	6	66,7 Nov, Febr, Mai, Juli

¹⁾ Abkürzungen siehe 2.4.3, Tab. 6 und 2.4.4, Tab. 7; n = Zahl untersuchter Proben

Tabelle 16 a-d : Nachweis von *Phytophthora* spp. mit dem Apfeltest**a) in Abhängigkeit vom Betrieb**

Betrieb Nr.	n	Proben mit <i>Phytophthora</i> spp. (%)
1	24	4,2
2	31	22,5
3	51	15,6
4	22	27,3

b) in Abhängigkeit vom Probenmaterial

Proben- material	n	Proben mit <i>Phytophthora</i> spp. (%)
Wasser	66	10,6
Sediment	62	24,1

c) in Abhängigkeit vom Probenahmetermin (siehe 2.4.4, Tab.7)

Termin	n	Proben mit <i>Phytophthora</i> spp. (%)
August	11	0
Oktober	21	0
November	21	28,6
Februar	16	12,5
März	17	29,4
Mai	21	4,8
Juli	21	38,0

d) in Abhängigkeit vom Probenahmeort

Probenahmeort ¹⁾	n	Proben mit <i>Phytophthora</i> spp. (%) und Probenahmetermin ¹⁾
Brunnen 1 BW	4	0
Brunnen 2 BW	4	0
Brunnen 3 BW	4	0
Brunnen 4 BW	4	0
Ablauf 1a AW	7	0
Ablauf 1b AW	6	16,7 Juli
Ablauf 2a AS	7	42,9 Nov, März, Mai
Ablauf 2b AS	6	16,7 Juli
Ablauf 3a AS	7	28,6 Nov, März
Ablauf 3b AS	7	14,3 Febr
Ablauf 3c AS	7	28,6 Nov, März
Ablauf 4 AS	6	16,7 Juli
Teich 1 TW	7	0
Teich 2 TW	7	28,6 Nov, Juli
Teich 2 TS	7	14,3 Nov
Teich 3a TW	7	14,3 Juli
Teich 3a TS	7	0
Teich 3b TW	6	33,3 März, Juli
Teich 3b TS	6	0
Teich 4 TW	6	16,7 Juli
Teich 4 TS	6	66,7 Nov, Febr, März, Juli

¹⁾ Abkürzungen siehe 2.4.3, Tab. 6 und 2.4.4, Tab. 7; n = Zahl untersuchter Proben

Tabelle 17 a-d: Nachweis von *Phytophthora* spp. mit dem Lupinentest**a) in Abhängigkeit vom Betrieb**

Betrieb Nr.	n	Proben mit <i>Phytophthora</i> spp..(%)
1	24	4,2
2	31	32,3
3	51	13,7
4	22	22,7

b) in Abhängigkeit vom Probenmaterial

Proben- material	n	Proben mit <i>Phytophthora</i> spp. (%)
Wasser	66	7,6
Sediment	62	29,0

c) in Abhängigkeit vom Probenahmetermin (siehe 2.4.4, Tab. 7)

Termin	n	Proben mit <i>Phytophthora</i> spp. (%)
August	11	27,3
Oktober	21	19,0
November	21	9,5
Februar	16	31,3
März	17	23,5
Mai	21	9,5
Juli	21	14,2

d) in Abhängigkeit vom Probenahmeort

Probenahmeort ¹⁾	n	Proben mit <i>Phytophthora</i> spp. (%) und Probenahmetermin ¹⁾
Brunnen 1 BW	4	0
Brunnen 2 BW	4	0
Brunnen 3 BW	4	0
Brunnen 4 BW	4	0
Ablauf 1a AW	7	0
Ablauf 1b AW	6	16,7 Okt
Ablauf 2a AS	7	85,7 Aug, Nov, Febr, März, Mai, Juli
Ablauf 2b AS	6	33,3 Febr, Juli
Ablauf 3a AS	7	42,8 Febr, März, Juli
Ablauf 3b AS	7	0
Ablauf 3c AS	7	28,6 Aug, März
Ablauf 4 AS	6	16,7 Okt
Teich 1 TW	7	0
Teich 2 TW	7	14,3 Febr
Teich 2 TS	7	14,3 Okt
Teich 3a TW	7	14,3 Aug
Teich 3a TS	7	0
Teich 3b TW	6	16,7 März
Teich 3b TS	6	0
Teich 4 TW	6	16,7 Nov
Teich 4 TS	6	50,0 Okt, Nov, Febr

¹⁾ Abkürzungen siehe 2.4.3, Tab. 6 und 2.4.4, Tab. 7; n = Zahl untersuchter Proben

Tabelle 18 a-d: Nachweis von *Phytophthora* spp. mit dem Rhododendronblatt-Test**a) in Abhängigkeit vom Betrieb**

Betrieb Nr.	n	Proben mit <i>Phytophthora</i> spp. (%)
1	24	8,3
2	31	71,0
3	51	43,1
4	22	68,1

b) in Abhängigkeit vom Probenmaterial

Proben- material	n	Proben mit <i>Phytophthora</i> spp. (%)
Wasser	66	27,3
Sediment	62	69,4

c) in Abhängigkeit vom Probenahmetermin (siehe 2.4.4, Tab. 7)

Termin	n	Proben mit <i>Phytophthora</i> spp. (%)
August	11	63,6
Oktober	21	52,3
November	21	47,6
Februar	16	56,3
März	17	58,8
Mai	21	33,3
Juli	21	33,3

d) in Abhängigkeit vom Probenahmeort

Probenahmeort ¹⁾	n	Proben mit <i>Phytophthora</i> spp. (%) und Probenahmetermin ¹⁾
Brunnen 1 BW	4	0
Brunnen 2 BW	4	0
Brunnen 3 BW	4	0
Brunnen 4 BW	4	0
Ablauf 1a AW	7	0
Ablauf 1b AW	6	33,3 Okt, Juli
Ablauf 2a AS	7	100,0 Aug, Okt, Nov, Febr, März, Mai, Juli
Ablauf 2b AS	6	100,0 Okt, Nov, Febr, März, Mai, Juli
Ablauf 3a AS	7	71,4 Aug, Okt, Nov, Febr, März
Ablauf 3b AS	7	14,3 März
Ablauf 3c AS	7	85,7 Aug, Okt, Nov, Febr, März, Mai
Ablauf 4 AS	6	83,3 Okt, Nov, Febr, März, Mai
Teich 1 TW	7	0
Teich 2 TW	7	85,7 Aug, Okt, Nov, Febr, März, Juli
Teich 2 TS	7	42,9 Aug, März, Mai
Teich 3a TW	7	42,9 Aug, Febr, Juli
Teich 3a TS	7	57,1 Aug, Okt, Nov, Mai
Teich 3b TW	6	50,0 Okt, Nov, März
Teich 3b TS	6	0
Teich 4 TW	6	66,7 Okt, Nov, Febr, Juli
Teich 4 TS	6	100,0 Okt, Nov, Febr, März, Mai, Juli

¹⁾ Abkürzungen siehe 2.4.3, Tab. 6 und 2.4.4, Tab. 7; n = Zahl untersuchter Proben

3.2.4 Vergleich der Verfahren zum Nachweis von *Phytophthora* spp.

- Nachweishäufigkeit

Der Rhododendronblatt-Test wies in nahezu der Hälfte aller untersuchten Praxisproben (Nachweisrate von etwa 48 %) *Phytophthora* spp. nach und war damit das erfolgreichste angewandte Nachweisverfahren in den Untersuchungen zum Nachweis von *Phytophthora*-Arten aus Praxisproben (Tab. 19). Er erwies sich gegenüber den geprüften Einflussfaktoren wie Baumschule, Probenmaterial, und dem Termin der Probenahme bzw. Jahreszeit unabhängig. Nur vom Ort der Probenahme war der Nachweiserfolg mit den Blättern, wie bei allen anderen geprüften Verfahren auch, beeinflusst. Wurde *Phytophthora* spp. mit den Blättern aus einer Probe nicht geködert, gelang zumeist auch kein Nachweis mit einem der übrigen Verfahren.

Mit dem ELISA-Verfahren wurde in weniger Proben *Phytophthora* spp. detektiert als mit dem Rhododendronblatt-Test, aber mehr als mit den Ködern Apfel und Lupine und den mikrobiologischen Tests. Das ELISA-Verfahren wies in 31,3 % aller Proben *Phytophthora*-Arten nach (Tab. 19). In der Baumschule Nr. 1, in der mit allen übrigen Verfahren keine oder nur eine sehr geringe Zahl an Nachweisen erfolgte, wurden mit dem ELISA als dem einzigen Testverfahren sowohl im rücklaufenden Wasser der Containerkulturflächen, als auch im Bewässerungsteich *Phytophthora* spp. nachgewiesen. Auch im Teichsediment des zweiten Teiches in der Baumschule Nr. 3 wies der ELISA als einziges Verfahren die Erreger nach.

Alle anderen Untersuchungsmethoden für Wasser- und Sedimentproben aus den Baumschulen wie mikrobiologische Methoden und die Köder Apfel und Lupine, wiesen in zwischen 17,2 und 19,5 % der Proben Erreger aus der Gattung *Phytophthora* nach (Tab. 19). Trotz der in etwa gleichen Nachweisrate wurden je nach Verfahren in völlig unterschiedlichen Proben je nach Baumschule, Material, Termin und Ort Vertreter aus der Gattung *Phytophthora* detektiert.

Tabelle 19: Nachweis von *Phytophthora* spp. in den Praxisproben mit den verschiedenen Verfahren (n = Zahl untersuchter Proben)

Nachweisverfahren	n	Proben mit <i>Phytophthora</i> spp. (%)
DAS-ELISA (beide Antiseren)	128	31,3
Mikrobiologische Verfahren	128	19,5
Apfeltest	128	17,2
Lupinentest	128	17,4
Rhododendronblatt-Test	128	47,6

- Isoliertes Artenspektrum

Das breiteste Spektrum an *Phytophthora*-Arten aus den Teichwasserproben wurde mit dem Rhododendronblatt-Test geködert. Arten wie *P. syringae*, *P. cambivora* und cf. *P. cambivora* konnten während der gesamten Versuchsdauer mit keinem der anderen Verfahren nachgewiesen werden. Insgesamt köderten die Blätter zehn unterschiedliche *Phytophthora*-Arten aus insgesamt drei bzw. vier verschiedenen WATERHOUSE-Gruppen. Des weiteren war der Rhododendronblatt-Test am erfolgreichsten, was das Ködern unbekannter *Phytophthora*-Isolate anbetraf. Ebenso wurden zahlenmäßig aus den Teichen die meisten Isolate, insgesamt 165, über dieses Verfahren geködert. Besonders häufig konnten die Arten cf. *P. gonapodyides*, *P. cryptogea* und cf. *P. cryptogea*, sowie *P. drechsleri* und cf. *P. drechsleri* aus den Rhododendronblättern isoliert werden (Tab. 20).

Weitaus weniger Arten wurden mit den übrigen Verfahren erfasst. Die mit dem mikrobiologischen Verfahren isolierten sechs verschiedenen *Phytophthora*-Arten gehörten nahezu ausschließlich der WATERHOUSE-Gruppe VI an. Dabei dominierten unter den insgesamt 33 isolierten Vertretern aus der Gattung *Phytophthora* die Arten *P. cryptogea*, cf. *P. cryptogea* und cf. *P. gonapodyides* (Tab. 20).

Die Äpfel köderten zahlenmäßig nur wenig mehr Isolate aus den Teichen, als die mikrobiologische Methode, köderten aber was die Zugehörigkeit der *Phytophthora*-Isolate zu den WATERHOUSE-Gruppen betraf, ein breiteres Spektrum. Die isolierten fünf verschiedenen *Phytophthora*-Arten stammten aus vier bzw. fünf unterschiedlichen WATERHOUSE-Gruppen. Cf. *P. gonapodyides* wurde genau wie mit den Rhododendronblättern am häufigsten isoliert. Die Äpfel köderten als einziges Verfahren die Art *P. cactorum* aus den Teichproben (Tab. 20).

Ebenfalls fünf *Phytophthora*-Arten, die aus zwei verschiedenen WATERHOUSE-Gruppen stammten, köderten die Lupinensämlinge aus den Proben. Nahezu alle geköderten Isolate gehörte der WATERHOUSE-Gruppe VI an. Wie bei den beiden anderen Ködern Apfel und Rhododendronblatt waren die Isolate cf. *P. gonapodyides* am häufigsten isoliert worden. Das Verfahren war, was die Zahl geködeter Erreger aus den Teichproben betraf, mit nur 15 *Phytophthora*-Isolaten am wenigsten erfolgreich (Tab. 20).

Tabelle 20: *Phytophthora*-Arten, die mit den verschiedenen Verfahren aus Teichwasser und -sedimentproben isoliert wurden

Nachweisverfahren	<i>Phytophthora</i> -Art	WH-Gruppe ¹⁾	Zahl Isolate
Mikrobiologische Verfahren	<i>P. spec. nov.</i>	II o. IV	1
	<i>P. cinnamomi</i>	VI	3
	<i>P. cryptogea</i> und cf. <i>P. cryptogea</i>	VI	11
	<i>P. drechsleri</i> und cf. <i>P. drechsleri</i>	VI	4
	cf. <i>P. gonapodyides</i>	VI	12
	cf. <i>P. richardiae</i>	VI	1
	unbekannt	V o. VI	1
Apfeltest	<i>P. cactorum</i>	I	6
	<i>P. citrophthora</i>	II	6
	<i>P. spec. nov.</i>	II o. IV	2
	<i>P. citricola</i>	III	4
	cf. <i>P. gonapodyides</i>	VI	17
Lupinentest	<i>P. citricola</i>	III	1
	<i>P. cryptogea</i> und cf. <i>P. cryptogea</i>	VI	2
	<i>P. drechsleri</i> und cf. <i>P. drechsleri</i>	VI	1
	cf. <i>P. gonapodyides</i>	VI	8
	cf. <i>P. undulata</i>	VI	3
Rhododendronblatt-Test	<i>P. citrophthora</i>	II	1
	<i>P. spec. nov.</i>	II o. IV	6
	<i>P. citricola</i>	III	5
	<i>P. syringae</i>	III	2
	<i>P. cambivora</i> und cf. <i>P. cambivora</i>	VI	5
	<i>P. cryptogea</i> und cf. <i>P. cryptogea</i>	VI	28
	<i>P. drechsleri</i> und cf. <i>P. drechsleri</i>	VI	26
	cf. <i>P. gonapodyides</i>	VI	63
	cf. <i>P. richardiae</i>	VI	4
	cf. <i>P. undulata</i>	VI	4
	unbekannt	V o. VI	13
	unbekannt	?	8

¹⁾ WH = Einteilung der *Phytophthora*-Arten nach STAMPS *et al.* 1990

3.3 Epidemiologie von *Phytophthora*-Arten im Wasserkreislauf von Praxisbetrieben

Mit den epidemiologischen Untersuchungen sollten möglichst viele Daten zum Vorkommen von *Phytophthora*-Arten in bundesdeutschen Baumschulen ermittelt werden, da über deren Verbreitung im Wasserkreislauf von Praxisanlagen bislang nichts bekannt war. Fragen wie, zu welchen Jahreszeiten, wann und wo welche *Phytophthora*-Arten auftreten waren unbeantwortet. Unabhängig vom jeweiligen Testverfahren wurden deshalb das Auftreten der Gattung *Phytophthora*, die Anzahl an Isolat, die *Phytophthora*-Arten, ihre Zugehörigkeit zu den WATERHOUSE-Gruppen und die Zahl der Isolate einer Art in Abhängigkeit von Baumschule, Probenahmeort innerhalb der Baumschulen, Material der Probe, Termin und Jahreszeit der Probenahme untersucht.

Alle über die mikrobiologischen Verfahren und Köderpflanzen isolierten *Phytophthora* spp. wurden nach der unter 2.6 beschriebenen Vorgehensweise bestimmt.

3.3.1 Vorkommen von *Phytophthora* spp. in Abhängigkeit der Baumschule und des Probenahmeortes

Phytophthora-Arten wurden im Wasserkreislauf aller untersuchten Baumschulen unabhängig von deren Aufbau der Systeme zur Wiederverwendung des Gießwassers und deren Alter nachgewiesen. Die Nachweishäufigkeit der Vertreter aus der Gattung *Phytophthora* in den Baumschulen war jedoch unterschiedlich. So wurden in den Baumschulen Nr. 2-4, die bereits mehr als 20 Jahre an dem jeweiligen Standort angesiedelt sind, mit allen Verfahren wesentlich häufiger *Phytophthora* spp. nachgewiesen, als in dem jungen Betrieb Nr. 1, der während des Beprobungszeitraums gerade drei Jahre alt war (Tab. 13 a, 15 a, 16 a, 17 a, 18 a).

Der Nachweis von *Phytophthora*-Arten hing in allen Betrieben vom Probenahmeort ab (Tab. 13 d, 15 d, 16 d, 17 d, 18 d). So gelang der Nachweis in jedem der Betriebe im ablaufenden Wasser oder Sediment unmittelbar an den Containerkulturflächen und in den Teichen, aber in keinem einzigen Brunnen. Bei der Betrachtung der Probenahmeorte Ablauf und Teich ergaben sich allerdings Unterschiede zwischen den Betrieben und innerhalb der Orte in bezug auf die Anzahl isolierter *Phytophthora* spp.

Die Abläufe innerhalb des Betriebs Nr. 2 waren am stärksten mit *Phytophthora* spp. kontaminiert. Der größte Teil isolierter *Phytophthora* spp. stammte aus Proben dieser beiden Abläufe. Mit 87 Isolat, aus Ablauf 2a wurden hier die meisten Isolate pro Ablauf gefunden. Demgegenüber wurden aus den beiden beprobten Abläufen 1a und 1b in dem jungen Betrieb Nr. 1 nur insgesamt sieben *Phytophthora*-Isolate während des gesamten Beprobungszeitraums gekodiert. Der Ablauf Nr. 1a blieb dabei als einziger Probenahmeort ohne *Phytophthora* spp. Nachweis, während in jedem der anderen Betriebe aus jedem beprobten

Ablauf während des Versuchszeitraums mindestens drei *Phytophthora*-Isolate geködert werden konnten (Tab. 21).

Tabelle 21: Zahl der *Phytophthora*-Isolate aus den Abläufen der Containerkulturflächen mit Wasserrückführung der Praxisbetriebe Nr. 1-4 (Termine Oktober – Juli ¹⁾)

	Betrieb							
	Nr. 1		Nr. 2		Nr. 3			Nr. 4
Ablauf ²⁾	a	b	a	b	a	b	c	a
Zahl Isolate	0	7	87	79	43	3	50	30

¹⁾ siehe 2.4.4 Tab. 7

²⁾ a-c beprobte ober- oder unterirdisch verlaufende Abläufe an verschiedenen Stellen innerhalb des Wasserrecyclingkreislaufts in den Baumschulen, siehe auch 2.4.3, Tab. 6

Im Gegensatz zu der jungen Baumschule, deren Teich zum Zeitpunkt der Beprobung etwa drei Jahre alt war und ohne erfolgreiche Isolierung der Erreger blieb, enthielten die mehr als 20 Jahre alten Teiche der Baumschulen Nr. 2-4 zahlreiche *Phytophthora*-Isolate. In dem Betrieb Nr. 2 wurde die größte Anzahl an *Phytophthora*-Isolaten nachgewiesen. Wie bei den Abläufen, konnten auch aus dem Teich dieser Baumschule die meisten Isolate, insgesamt 91, geködert werden. Die geringste Menge *Phytophthora*-Isolate wurde in dem zweiten Bewässerungsteich in der Baumschule Nr. 3 detektiert, aus ihm stammten nur 24 Isolate (Tab. 22).

In jedem der älteren Baumschulbetriebe konnten jeweils zwischen sieben und acht verschiedene *Phytophthora*-Arten – neben denjenigen, deren eindeutige Bestimmung nicht möglich war – isoliert und identifiziert werden. Obwohl das vorgefundene Artenspektrum je nach Baumschule unterschiedlich war, überwogen grundsätzlich in allen Betrieben die *Phytophthora*-Arten der WATERHOUSE-Gruppe VI, und zwar sowohl bezüglich der Zahl geködeter Arten, als auch der Isolate. In dem Betrieb Nr. 4 stammten lediglich zwei von 85 isolierten *Phytophthora*-Isolaten aus einer anderen als den WATERHOUSE-Gruppen V und VI (Tab. 22).

Am häufigsten wurde cf. *P. gonapodyides* isoliert. Diese Art war mit insgesamt 46 Isolaten die hauptsächlich isolierte *Phytophthora*-Art aus Wasser und Sediment des Teichs in Betrieb Nr. 4 und ebenfalls aus dem zweiten Bewässerungsteich (B) des Betriebs Nr. 3. Ebenfalls in allen Teichen der älteren Betriebe kamen *P. cryptogea*, cf. *P. cryptogea*, sowie als *P. drechsleri* und cf. *P. drechsleri* identifizierte *Phytophthora*-Isolate vor. Besonders zahlreich geködert wurden diese Arten in Baumschule Nr. 2. Desgleichen wurden die zur WATERHOUSE-Gruppe II gehörende Art *P. citrophthora* und eine neue *Phytophthora*-Art, allerdings in geringerer Anzahl, in jedem der Wasserreservoirs innerhalb des Beprobungszeitraums nachgewiesen (Tab. 22). Die neue Art ist noch keiner WATERHOUSE-Gruppe zuge-

ordnet, aufgrund der Ausbildung einer weit bzw. wenig vorstehenden Papille der Sporangien und amphigynen Antheridien gehört sie entweder in die Gruppe II oder IV (WERRES & MARWITZ 1997, WERRES *et al.* 2001).

Nur in zwei der drei Betriebe konnten die Arten *P. cambivora*, cf. *P. cambivora*, *P. citricola* und cf. *P. richardiae* isoliert werden. Eine größere Gruppe nicht eindeutig identifizierbarer Isolate, die z.T. zu den WATERHOUSE-Gruppen V oder VI gehörten, wurde aus dem Bewässerungsteich der Baumschule Nr. 2 isoliert. Der Nachweis der *Phytophthora*-Arten *P. syringae*, cf. *P. undulata*, sowie *P. cactorum* und *P. cinnamomi* gelang jeweils nur innerhalb einer Baumschule (Tab. 22).

3.3.2 Vorkommen von *Phytophthora* spp. in Abhängigkeit des Probenmaterials

Sowohl im Wasser, als auch im Sediment wurden mit den Testverfahren Strukturen von *Phytophthora* spp. in allen beprobten Bewässerungsreservoirs nachgewiesen. Die Häufigkeit, mit der die Erreger im jeweiligen Medium auftraten und nachgewiesen wurden, war jedoch unterschiedlich und hing von dem beprobten Teich ab (Tab. 22).

In den drei Teichen der Baumschulen Nr. 2 und 3 wurde während des Beprobungszeitraums jeweils eine größere Anzahl an *Phytophthora*-Arten und -Isolaten im Wasser als im Sediment nachgewiesen (Tab. 22).

In Baumschule Nr. 2 wurden nur etwa halb so viele Erregerisolate aus dem Sediment geködert wie aus dem Wasser. Aus dem Sediment des zweiten Bewässerungsteiches (3B) in der Baumschule Nr. 3 wurde sogar während des gesamten Probenahmezeitraumes keine einzige *Phytophthora*-Art isoliert. Nur in Betrieb Nr. 4 verhielt es sich anders. Hier waren Artenvielfalt und auch die Gesamtzahl der 63 detektierten Isolate im Sediment größer als im Wasser. Aus dem Teichwasser konnten insgesamt nur 22 *Phytophthora*-Isolate geködert werden (Tab. 22).

Das Artenspektrum der aus Wasser und aus Sediment geköderten *Phytophthora* spp. war unterschiedlich. Die Mehrheit der *Phytophthora*-Arten wurde aus beiden Probenmaterialien isoliert, einige Arten ausschließlich aus dem Teichwasser und eine einzige *Phytophthora*-Art, nämlich *P. cinnamomi*, wurde nur aus Sediment isoliert (Tab. 22).

Bei den Arten, die sowohl aus dem Wasser, als auch aus dem Sediment des jeweiligen Teiches und aus allen Baumschulen isoliert wurden, überwogen vor allem diejenigen der WATERHOUSE-Gruppe VI. Die am häufigsten aus den beiden Probenmaterialien isolierten *Phytophthora*-Arten waren cf. *P. gonapodyides*, *P. cryptogea*, cf. *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, cf. *P. drechsleri*. Welche der Arten häufiger aus Wasser oder aus Sediment stammte, hing vom jeweiligen Teich ab. So wurden z.B. in Betrieb Nr. 2 sowohl aus dem Teichwasser 14, aus dem Sediment zwölf cf. *P. gonapodyides*-Isolate geködert. In dem Teich A des Betriebs

Nr. 3 wurde diese *Phytophthora*-Art häufiger aus dem Wasser, als aus dem Sediment, im Teich B dieser Baumschule sogar ausschließlich aus dem Wasser isoliert und in Betrieb Nr. 4 verhielt es sich umgekehrt. In diesem Teich wurde die Mehrzahl von cf. *P. gonapodyides* im Sediment nachgewiesen (Tab. 22).

Andere *Phytophthora*-Arten wurden ebenfalls im Wasser und im Sediment, allerdings nicht immer innerhalb desselben Teichs und nicht in allen Betrieben, sowie insgesamt in geringerer Anzahl als die bereits aufgeführten *Phytophthora*-Arten, isoliert. Dies waren die zu der WATERHOUSE-Gruppe VI gehörenden Arten cf. *P. undulata* und cf. *P. richardiae*, sowie einige unbekannte Isolate, *P. citrophthora* aus der WATERHOUSE-Gruppe II und die neue Art *P. spec. nov.* (WERRES & MARWITZ 1997, WERRES *et al.* 2001) (Tab. 22).

Bestimmte *Phytophthora*-Arten wurden ausschließlich im Wasser detektiert. Es handelte sich um *P. cactorum*, *P. citricola*, *P. syringae* und *P. cambivora*, cf. *P. cambivora*. Diese Arten gehörten, mit Ausnahme von *P. cambivora*, cf. *P. cambivora*, den WATERHOUSE-Gruppen I bzw. III an. Sie kamen aber nicht in allen Betrieben vor. Beispielsweise wurde *P. citricola* aus dem Wasser der Teiche der Betriebe Nr. 2 und Nr. 3 isoliert, nicht aber aus Betrieb Nr. 4. (Tab. 22).

Tabelle 22: Isolierte *Phytophthora*-Arten aus dem Teichwasser und -sediment der verschiedenen Baumschulen (Nr. 1-4)

Phytophthora-Arten WH-Gruppe ¹⁾	Zahl Isolate								
	Nr. 1 Wasser	Nr. 2		Nr. 3A		Nr. 3B		Nr. 4	
		Wasser	Sedi- ment	Wasser	Sedi- ment	Wasser	Sedi- ment	Wasser	Sedi- ment
<i>P. cactorum</i>	0	0	0	6	0	0	0	0	0
<i>P. citrophthora</i>	0	0	1	5	0	0	0	1	0
<i>P. spec. nov.</i>	0	7	0	1	0	0	0	0	1
<i>P. citricola</i>	0	2	0	5	0	3	0	0	0
<i>P. syringae</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. cambivora</i> / cf. <i>P. cambivora</i>	0	0	0	4	0	0	0	1	0
<i>P. cinnamomi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>P. cryptogea</i> / cf. <i>P. cryptogea</i>	0	12	8	0	3	1	0	2	15
<i>P. drechsleri</i> / cf. <i>P. drechsleri</i>	0	12	8	4	5	1	0	0	1
cf. <i>P. gonapodyides</i>	0	14	12	7	2	19	0	17	29
cf. <i>P. richardiae</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	3
cf. <i>P. undulata</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	6
unbekannt	0	3	4	1	1	0	0	0	5
unbekannt	0	8	0	0	0	0	0	0	0
Summe Isolate	0	62	33	33	11	24	0	22	63

0 = Nachweis von *Phytophthora* spp. negativ¹⁾ Einteilung der *Phytophthora*-Arten nach STAMPS *et al.* 1990²⁾ Isolate konnten keiner WH-Gruppe eindeutig zugeordnet werden

3.3.3 Vorkommen von *Phytophthora* spp. in Abhängigkeit des Probenahmetermins und der Jahreszeit

Während des gesamten Probenahmezeitraumes wurden unabhängig von dem Probenahmetermin und der Jahreszeit *Phytophthora*-Arten in den Betrieben nachgewiesen. Abhängig vom Probenahmetermin waren jedoch die Anzahl der Proben, in denen *Phytophthora* spp. detektiert werden konnte und die Menge der Isolate, sowie das zu jedem Termin bzw. Jahreszeit aus den Teichen geködete *Phytophthora*-Artenspektrum.

Die Zahl der Proben, in denen die *Phytophthora* spp. nachgewiesen werden konnten, betrug in den Monaten Februar und März etwa 88 % und lag damit im Winter und im beginnenden Frühjahr höher als zu den übrigen Beprobungsterminen. Noch in 76,5 % bzw. 82,3 % der Proben wurden im Sommermonat Juli und im Herbstmonat Oktober *Phytophthora*-Arten detektiert, zu allen anderen Zeitpunkten war die Nachweisrate geringer (Tab. 23).

Auch die Anzahl der mit den Verfahren isolierten Vertreter aus der Gattung *Phytophthora* war zu jedem Zeitpunkt unterschiedlich. Die meisten Isolate konnten in den Monaten Februar, März und Juli gekodiert werden, die wenigsten im August und Oktober (Tab. 23).

Tabelle 23: Nachweis von *Phytophthora* spp. und Zahl der Isolate in Abhängigkeit des Probenahmetermins ¹⁾ (n = Anzahl untersuchter Proben ohne Brunnenwasserproben)

Probenahmetermin	n	Proben mit <i>Phytophthora</i> spp. (%)	Zahl Isolate
August	11	63,6	19
Oktober	17	82,3	23
November	17	58,8	73
Februar	16	87,5	109
März	17	88,2	146
Mai	17	58,8	76
Juli	17	76,5	116

¹⁾ siehe 2.4.4, Tab. 7

Das weiteste Spektrum an *Phytophthora*-Arten, insgesamt neun verschiedene Arten, wurde in dem Sommermonat Juli aus den Teichen isoliert. In den Monaten November, Februar und März betrug die Anzahl gekodierter Arten zusammen mit den unbekannten *Phytophthora*-Arten jeweils acht, an allen anderen Beprobungsterminen war sie geringer (Tab. 24).

Jeder der Beprobungstermine war durch ein bestimmtes *Phytophthora*-Artenspektrum charakterisiert, da die Mehrheit der isolierten *Phytophthora*-Arten vom Probenahmetermin abhängig war. Das bedeutet, bestimmte *Phytophthora*-Arten wurden nur zu ganz bestimmten Zeitpunkten oder Jahreszeiten aus den Teichen isoliert. So konnten die wärmeliebenden Arten *P. citricola* nur zu den Sommerterminen und im Herbst aus den Teichen isoliert, *P. cinnamomi* nur im Mai und *P. cactorum* nur im Juli gekodiert werden. Abhängig von dem

Probenahmetermin war auch die Isolierung von *P. cambivora* und cf. *P. cambivora*, die nur im Juli gelang. *P. spec. nov.* (WERRES & MARWITZ 1997, WERRES *et al.* 2001) dagegen wurde nur im Spätherbst, Winter und beginnendem Frühjahr detektiert, ebenso cf. *P. undulata*. Die kälteliebende Art *P. syringae* wurde ausschließlich im November geködert. Das Auftreten der unbekannten *Phytophthora*-Arten war ebenfalls abhängig vom Probenahmetermin. So traten beispielsweise bislang unbekannte *Phytophthora*-Isolate nur im März und November auf (Tab. 24).

Im Gegensatz dazu gab es mehrere Arten wie *P. cryptogea* und cf. *P. cryptogea*, *P. drechsleri* und cf. *P. drechsleri*, cf. *P. lateralis* und cf. *P. gonapodyides*, die weitestgehend unabhängig von der Jahreszeit und zu fast allen Terminen isoliert wurden (Tab. 24).

Alle von dem Probenahmetermin unabhängig isolierten *Phytophthora*-Arten gehörten der WATERHOUSE-Gruppe VI an, die der nur zu bestimmten Zeitpunkten geköderten Arten überwiegend zu anderen WATERHOUSE-Gruppen (Tab. 24).

Tabelle 24: Isolierte *Phytophthora*-Arten aus den Teichen der Baumschulen in Abhängigkeit des Probenahmetermins¹⁾

Phytophthora-Arten	WH-Gruppe ²⁾	Probenahmetermin						
		Februar	März	Mai	Juli	August	Oktober	November
<i>P. cactorum</i>	I	0	0	0	X	0	0	0
<i>P. citrophthora</i>	II	0	0	0	X	0	0	X
<i>P. spec. nov.</i>	II o. IV	X	X	0	0	0	0	X
<i>P. citricola</i>	III	0	0	0	X	X	X	0
<i>P. syringae</i>	III	0	0	0	0	0	0	X
<i>P. cambivora</i> / cf. <i>P. cambivora</i>	VI	0	0	0	X	0	0	0
<i>P. cinnamomi</i>	VI	0	0	X	0	0	0	0
<i>P. cryptogea</i> / cf. <i>P. cryptogea</i>	VI	X	X	X	X	0	X	X
<i>P. drechsleri</i> / cf. <i>P. drechsleri</i>	VI	X	X	X	X	X	X	0
cf. <i>P. gonapodyoides</i>	VI	X	X	0	X	X	X	X
cf. <i>P. richardiae</i>	VI	X	0	X	X	0	0	X
cf. <i>P. undulata</i>	VI	X	X	0	0	0	0	X
unbekannt	V o. VI	X	X	0	0	X	0	0
unbekannt	? ³⁾	0	X	0	0	0	0	X

X = Nachweis von *Phytophthora* spp. positiv, 0 = Nachweis von *Phytophthora* spp. negativ¹⁾ siehe 2.4.4, Tab. 7²⁾ Einteilung der *Phytophthora*-Arten nach STAMPS *et al.* 1990³⁾ Isolate konnten keiner WH-Gruppe eindeutig zugeordnet werden

4 Diskussion

4.1 Verfahren zum Nachweis von *Phytophthora* spp.

Die Nachweisraten von *Phytophthora* spp. in den Proben aus den Baumschulen variierten in Abhängigkeit des jeweiligen Verfahrens. Zudem waren die Ergebnisse der *in vitro* und der Praxisuntersuchungen sehr unterschiedlich. Dafür kann es zahlreiche Ursachen geben:

Die Spezifität eines Verfahrens ist für den Nachweiserfolg entscheidend. Ein hoher Spezifitätsgrad hat den Vorteil, dass nur eine einzige Art oder sogar Struktur einer Art detektiert werden kann. Beispielsweise wurde ein sehr sensibler *Dip-Stick-Immunoassay* (CAHILL & HARDHAM 1993, 1994) entwickelt, der aber nur den *in vitro* Nachweis von *P. cinnamomi* Zoosporen zulässt. Der gewünschte Grad an Spezifität hängt aber immer vom Untersuchungsziel ab. In Baumschulen mit Containerkulturflächen mit Wasserrückführung ist es völlig unbekannt, ob *Phytophthora* spp. überhaupt, und wenn, welche Arten vorkommen. Dazu kann das Artenspektrum innerhalb eines Jahres oder von Jahr zu Jahr z.B. mit dem wechselnden Pflanzensortiment variieren. Deshalb muss ein geeignetes Verfahren in erster Linie neben der Gattungsspezifität ein möglichst breites Artenspektrum erfassen. Ob das in einer Probe möglich ist, hängt nicht zuletzt von der benutzten Methode ab. Verwendet man z.B. als Köder Citrusblätter (GRIMM & ALEXANDER 1973), die nur für die *Phytophthora*-Arten *P. citrophthora* und *P. parasitica* empfindlich sind, können in einer zu untersuchenden Probe eben genau nur diese Arten detektiert werden. Dazu kommt die Ungewissheit, ob ein Köder wie z.B. Eukalyptus (MARKS & KASSABY 1972) die im gemäßigten norddeutschen Klima angesiedelten *Phytophthora*-Arten detektiert. Die Attraktivität eines Köders für eine bestimmte *Phytophthora*-Art bedingt also auch den Nachweiserfolg (ERWIN & RIBEIRO 1996, S. 18-24). Der Nachweis von *Phytophthora*-Arten mit Hilfe verschiedener Selektivmedien wurde von den enthaltenen Zusätzen stark beeinflusst. Diejenigen Medien, die den Zusatz Hymexazol enthielten, waren zur Isolierung von *P. cactorum* und z.T. von *P. citricola* ungeeignet. Beim Einsatz in der Praxis würden diese Arten nicht isoliert werden, ein falsch-negatives Ergebnis wäre die Folge. Auch HANSEN *et al.* 1979 stellten fest, dass *P. cactorum*, *P. lateralis* und ein unbekanntes *Phytophthora*-Isolat durch den Wirkstoff Hymexazol stark gehemmt wurden. Gleichzeitig blieben zwei der ebenfalls getesteten *Pythium*-Isolate im Wachstum unbeeinflusst, obwohl der Wirkstoff gerade zur Hemmung dieser eng verwandten Gattung empfohlen wird (RIBEIRO 1983, S. 61-63). Auf Hymexazol sollte daher verzichtet werden. Selbst das ausgewählte Selektivmedium in den eigenen Untersuchungen führte beim Auslegen der Filterproben zum schlechtesten Ergebnis der gesamten Praxisuntersuchungen. Ein Grund dafür ist sicherlich die hohe Empfindlichkeit von *Phytophthora*-Arten gegenüber verschiedenen Antibiotika und Fungiziden (JEFFERS & MARTIN 1986, KATO *et al.* 1990, sowie ERWIN & RIBEIRO 1996, S. 10-18).

Man weiß nicht, welche *Phytophthora*-Strukturen zu welcher Jahreszeit und an welchem Ort innerhalb des Recyclingsystems in den Baumschulen vorkommen. Im Wasser werden vor

allen die beweglichen Zoosporen vermutet, durchaus wahrscheinlich ist aber auch, dass aus dem Teichsediment durch Aufwirbelung des Wassers bei Pumpvorgängen oder durch infiziertes Pflanzenmaterial auch andere Organe in den Wasserkreislauf gelangen. Möglichst alle *Phytophthora*-Strukturen sollten deshalb mit einem Verfahren detektiert werden können. Jede *Phytophthora*-Struktur kann Einfluss auf die Spezifität eines Verfahrens haben. So reagierten Papaya-Sämlinge als Köder gegenüber Sporangien, Zoosporen und Chlamydosporen von *P. palmivora* unterschiedlich empfindlich (KO & CHAN 1974). Meistens werden Untersuchungen zur Spezifität nur mit einer einzigen Struktur wie Myzel oder Zoosporen durchgeführt (CHEE & NEWHOOK 1965, PSCHIEDT *et al.* 1992, CAHILL & HARDHAM 1994). Gerade beim Einsatz von Kulturen auf festen und aus flüssigen Medien sind aber vielfach neben dem Myzel noch Verbreitungseinheiten wie Chlamydosporen oder Oosporen vorhanden (siehe 2.3.2, Tab. 4), die das Testergebnis beeinflussen können. Vor diesem Hintergrund sind auch die scheinbar widersprüchlichen Aussagen zur Spezifität des Lupinentests zu sehen. CHEE & NEWHOOK 1965 gelang es nicht, Lupinensämlinge mit Zoosporen von *P. cactorum* und *P. cryptogea* zu infizieren. Andere *Phytophthora*-Strukturen wurden nicht geprüft. Sie folgerten daraus, dass die Lupine zum Ködern dieser Arten ungeeignet sei. Bei PRATT & HEATHER 1972 dagegen war die Infektion der Sämlinge sowohl mit *P. cactorum*, als auch mit *P. cryptogea* und *P. drechsleri* erfolgreich. Sie verwendeten ein Gemisch aus Myzel, Dauersporen und Sporangien. Auch in den eigenen Untersuchungen reagierten die Lupinen nicht mit den Zoosporen von *P. cactorum* und *P. drechsleri*, aber mit deren Strukturen auf festen Medien.

Die Nachweisraten einzelner *Phytophthora*-Arten mit einem Verfahren hingen auch davon ab, ob *in vitro* oder *in situ* untersucht wurde. *In vitro* köderten alle drei Köderpflanzen die Isolate von *P. citricola*, *P. cryptogea* und *P. drechsleri* in etwa gleich gut, aber bei den Praxisuntersuchungen waren die Nachweisraten von Apfel und Lupine erheblich niedriger als die der Rhododendronblätter. Das gegen *P. cactorum* gerichtete Antiserum im DAS-ELISA wies in den Versuchen unter kontrollierten Bedingungen ein weites Spektrum an *Phytophthora*-Arten nach und war gegenüber Zoosporen sensitiver als das gegen *P. cinnamomi* gerichtete Antiserum. Bei der Untersuchung von Praxismaterial hingegen konnte, gegenüber dem *P. cinnamomi*-Antiserum und auch allen übrigen Verfahren, mit dem Antiserum gegen *P. cactorum* nur in wenigen Proben *Phytophthora* spp. nachgewiesen werden. Das könnte bedeuten, dass das gegen *P. cactorum* gerichtete Antiserum gegenüber Zoosporen anderer *Phytophthora*-Arten nicht so sensitiv ist, oder dass die Zoosporenmengen in den Proben nicht ausreichten oder auch beides zusammen.

Einheitliche Grenzwerte über z.B. eine zu einer erfolgreichen Infektion notwendige Zahl an Zoosporen oder eine im Boden oder Wasser noch tolerierbare Menge an *Phytophthora*-Strukturen existieren nicht. Die wenigen in Untersuchungen angegebenen Werte beziehen sich in der Regel auf eine einzige *Phytophthora*-Art und variieren sehr stark (BENSON & JONES 1980; SHEW & BENSON 1982; BRUCK & KENERLEY 1983; KOLB 1986). Infolgedessen muss zunächst davon ausgegangen werden, dass jede *Phytophthora*-Struktur, die sich

innerhalb des geschlossenen Wasserkreislaufs der Baumschulen befindet, auch eine potentielle Gefahr darstellt. Wichtig ist es daher, mit einem Verfahren auch noch geringe Mengen an *Phytophthora*-Einheiten nachzuweisen. Die Sensitivität der Nachweisverfahren hing allerdings von der untersuchten *Phytophthora*-Art und der untersuchten Struktur selber ab. So gelang es zwar mit den Lupinen *in vitro* noch eine Zoospore von *P. cinnamomi* pro ml nachzuweisen, wie bei CHEE & NEWHOOK 1965, anhand der Praxisuntersuchungen bestätigte sich jedoch diese hohe Empfindlichkeit nicht. Sensitivitätsgrenzen von Testverfahren werden in der Literatur nur selten angegeben, denn in der Regel sind sie leicht durch andere Faktoren beeinflussbar. GERRETSON-CORNELL 1976 konstatierte beispielsweise erhebliche Unterschiede beim Ködern von *P. cinnamomi* mit dem Lupinentest in Abhängigkeit des Metallionengehaltes des Wassers. Die Testempfindlichkeit des *Dip-Stick-Immunoassays* hing u.a. vom Reaktionsgefäß ab. Sie war etwa um den Faktor acht erhöht, wenn Standard-ELISA-Platten benutzt wurden (CAHILL & HARDHAM 1994). Die Bandbreite ermittelter Grenzwerte für Zoosporen mit Hilfe des ALERT-AGRISCREEN Testkits reichte von weniger als einer Zoospore pro ml (ADGEN DIAGNOSTIC SYSTEMS 1995) über 30 bis 40 Zoosporen (ALISHTAYEH, MACDONALD & KABASHIMA 1991) bis hin zu 15 bis 100 Zoosporen (MACDONALD *et al.* 1994). Hier wurde die Sensitivität des Verfahrens vor allem durch hohe Kreuzreaktionen negativ beeinflusst. Im ELISA variierten die Nachweisgrenzen, wie in den eigenen Untersuchungen auch, je nach verwendetem Antiserum (BRIELMAIER-LIEBETANZ & SADOWSKA-RYBAK 1994).

Unterschiedliche Nachweisgrenzen für bestimmte Strukturen können auch Ursache für die ungenügende Erfassung des Pathogens mit einer Nachweismethode sein. Wurden in den Untersuchungen zur Sensitivität die Zoosporenkonzentrationen von *P. cinnamomi* und *P. cactorum* erhöht, war ein Nachweis möglich, obwohl in den Untersuchungen zur Spezifität mit der eingesetzten Zoosporenmenge kein Nachweis erzielt worden war. So konnten *P. cinnamomi*-Zoosporen mit dem Antiserum, das gegen *P. cinnamomi* gerichtet war im DAS-ELISA doch noch nachgewiesen und mit *P. cactorum*-Zoosporen die Lupinensämlinge und die Rhododendronblätter infiziert werden. Diese Ergebnisse liefern auch eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Aussagen zum Nachweis von *P. cactorum*-Zoosporen mit Hilfe von Lupinensämlingen. Im Gegensatz zu CHEE & NEWHOOK 1965 wurden nämlich in späteren Untersuchungen Lupinen erfolgreich mit Zoosporen von *P. cactorum* infiziert (DANCE, NEWHOOK & COLE 1975).

Die Empfindlichkeit eines Testverfahrens gegenüber unbekannten oder neuen *Phytophthora*-Arten ist für die Baumschuler von großer Bedeutung, denn das Sortiment auf den Containerkulturflächen wechselt und ein großer Teil der Ware wird zugekauft. Das hat zur Folge, dass damit gerechnet werden muss, dass auch neue *Phytophthora*-Arten in die Betriebe eingeschleppt werden und sich bei für sie günstigen Bedingungen ausbreiten und etablieren können. Gerade aus Wasser- und Bodenproben wurden vermehrt unbekannte *Phytophthora*-Arten isoliert (MCINTOSH 1966; TAYLOR 1977; SHEARER & LANE 1983; ALISHTAYEH & MACDONALD 1991; BOLAY 1994). Sollten mit latent infizierten Pflanzen neue

Phytophthora-Arten in die Baumschulen gelangen, ist es wichtig, diese so schnell wie möglich innerhalb des Wasserkreislaufs nachzuweisen. Der Rhododendronblatt-Test scheint sich dafür am besten zu eignen, denn er wies in den Praxisuntersuchungen die meisten unbekannten Isolate und auch die neue *Phytophthora*-Art am häufigsten nach.

Bei einem Fassungsvermögen der untersuchten Baumschulteiche von bis zu 6000 m³ Wasser ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich *Phytophthora*-Einheiten auch in der entnommenen Probe befinden, nicht sehr groß. Deshalb spielt die Möglichkeit, mit einer Testmethode große Probenvolumina zu screenen eine wichtige Rolle. Je geringer der zu untersuchende Probenumfang, desto geringer ist die Chance, *Phytophthora* spp. zu detektieren. Beispielsweise können mit der Apfelködermethode nur relativ geringe Volumina an Wasser oder Sediment untersucht werden (DANCE, NEWHOOK & COLE 1975). Um dennoch mit dem Apfeltest, den mikrobiologischen Tests oder dem DAS-ELISA entsprechend große Volumina untersuchen zu können, bedarf es der vorherigen Konzentration der Untersuchungsflüssigkeit und darin evtl. vorhandener Oomycetenstrukturen. Durch Zentrifugieren oder Filtern können aber Verluste entstehen, indem z.B. *Phytophthora*-Organe an kolloide Teilchen im Wasser oder auch auf dem Filter haften bleiben und deshalb nicht erfasst werden (MACDONALD *et al.* 1994). Verfahren wie der Rhododendronblatt- und der Lupinentest, die ein Screening großer Probenmengen ohne Vorbehandlung erlauben, sind daher im Vorteil.

Ein möglichst geringer Zeitaufwand und eine einfache Durchführung sind für ein Verfahren, dass zur Testung von Praxisbetrieben auf *Phytophthora* spp. eingesetzt werden soll von Bedeutung. Der DAS-ELISA lieferte innerhalb des kürzesten Zeitraums, nämlich zwei Tage, Ergebnisse, fordert aber durch Probenvor- und -aufbereitung und Durchführung mehr Aufwand und geschultes Personal. Obwohl es bei den Ködertests fünf Tage dauerte, bis Symptome zu sehen waren und noch weitere fünf Tage, bis zur Reisolierung, so sind sie doch leichter handzuhaben, als die mikrobiologischen Methoden und der DAS-ELISA. Der Rhododendronblatt-Test erwies sich als am einfachsten durchführbar, da das ganze Jahr über Blätter im Gewächshaus kultivierter Pflanzen gepflückt werden können - unreife Äpfel dagegen sind nicht ganzjährig verfügbar. Lupinen sind nur bis zu einem bestimmten Stadium für *Phytophthora*-Arten empfindlich (CHEE & NEWHOOK 1965). Die vergleichsweise aufwendige Anzucht muss deshalb ständig wiederholt werden. Zur Durchführung eines Verfahrens gehören unweigerlich Maßnahmen, die die Nachweissicherheit erhöhen, so dass Störungen der Testreaktion möglichst vermieden werden sollten. Die zu untersuchenden Praxisproben, besonders die Sedimentproben, waren sehr stark mit Bakterien und *Pythium* spp. kontaminiert. Köderpflanzen sind in dieser Hinsicht besonders anfällig, da solche Nicht-Ziel-Organismen die Symptombeurteilung und Reisolierung von *Phytophthora* spp. erschweren. Am einfachsten waren die von *Phytophthora* spp. verursachten, typischen Flecken (siehe 2.5.4.3, Abb. 14) an den Rhododendronblättern zu erkennen. Außerdem erschwert die Verwendung ganzer, unverletzter Blätter das Eindringen von Mikroorganismen. An den Äpfeln verursachen *Pythium* spp. oder Bakterien optisch gleiche Symptome, aber die hervorgerufenen Verbräunungen sind in ihrer Konsistenz extrem weich im Vergleich zu

den von *Phytophthora* spp.. Zudem bietet der Apfel ein niedriges pH-Milieu, welches die Besiedelung mit *Phytophthora* spp. begünstigt und Bakterien unterdrückt. Gar nicht zu unterscheiden waren dagegen die Symptome von *Pythium* spp. und *Phytophthora* spp. an den Lupinensämlingen. Des weiteren konnten in den Untersuchungen *P. drechsleri* und cf. *P. drechsleri* aus symptomlosen Hauptwurzeln reisoliert werden. Auch GERRETSON-CORNELL 1976 schildert dieses Phänomen. Solche Umstände führten unweigerlich zu Verlusten, was eine Erklärung für das schlechte Abschneiden des Tests bei den Praxisuntersuchungen sein könnte. Beim Apfeltest wird die Nachweissicherheit zusätzlich dadurch erhöht, dass die zu untersuchende Proben direkt in das Gewebe appliziert werden können. Daher wies der Apfel in den *in vitro* Untersuchungen meist höhere Symptomentwicklungs- und Reisolierungsraten auf. Im Lupinen- und Rhododendronblatt-Test ist dagegen die Ausbildung von Zoosporen, die aktiv zu den Blättern bzw. Wurzeln schwimmen müssen, Voraussetzung.

Aus den ermittelten Ergebnissen ist schnell ersichtlich, dass die Anforderungen an ein Nachweisverfahren für *Phytophthora* spp. aus Recyclinganlagen von Baumschulen nicht von einem einzelnen Verfahren allein erfüllt werden können. Deshalb wird eine Kombination aus zwei Verfahren vorgeschlagen, und zwar aus dem DAS-ELISA mit dem gegen *P. cinnamomi* gerichteten Antiserum und dem Rhododendronblatt-Test. Der DAS-ELISA und der Rhododendronblatt-Test wiesen am häufigsten *Phytophthora* spp. nach, und zwar unabhängig von den untersuchten Einflussfaktoren aus der Praxis. Sie lieferten damit zuverlässigere Aussagen in bezug auf den Nachweis von *Phytophthora* spp. als die anderen Verfahren. Auch wenn erste Untersuchungsergebnisse keine nennenswerten Nährstoffeinträge und Pflanzenschutzmittelrückstände in Wasser und Sediment der Teiche erbrachten (LÜTTMANN 1998; Daten der LWK Weser-Ems, siehe Anhang Tab. A1, A2), ist ein möglicher Einfluss auf die Reaktivität einiger Testverfahren doch nicht ganz auszuschließen. Aufgrund der vielen Nachweise kann aber davon ausgegangen werden, dass ELISA und Rhododendronblatt-Test weitestgehend robust gegenüber den im Praxismaterial existenten Bedingungen sind. Beide Testverfahren sind kostengünstig: Der Blatt-Test, da er unkompliziert und sogar vom Baumschuler selbst durchführbar ist - nur zur Auswertung wird geschultes Personal benötigt. Der ELISA, da dieser in den Pflanzenschutzämtern bereits als Routine-technik zur Virusdiagnose etabliert ist, so dass in der Regel noch Kosten für die Herstellung der Antiseren, nicht aber für Geräte anfallen würden. Beide Verfahren ergänzen sich zudem hervorragend: Der ELISA liefert innerhalb von zwei Tagen den Nachweis. Ob es sich bei dem erfassten Material um lebendige Strukturen der Oomyceten handelt, kann er nicht leisten, da lebendes und totes Material gleichermaßen erfasst wird. Der Rhododendronblatt-Test liefert dann die noch fehlenden Aussagen. Zum einen bringt er den sicheren Nachweis, dass das detektierte Material auch vital ist, da die *Phytophthora* spp. aktiv in unverletztes Pflanzengewebe eindringen muss. Zum zweiten liefert er das umfassendste Bild des in der Probe vorhandenen Artenspektrums.

4.2 Epidemiologie von *Phytophthora* spp.

Phytophthora spp. sind wesentlich weiter innerhalb deutscher Praxisbetriebe verbreitet, als gemeinhin bislang vermutet wurde. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen damit Untersuchungen aus anderen Ländern, dass es den Oomyceten gelingt, sich innerhalb des Wasserkreislaufs von Baumschulen zu etablieren (KLOTZ, WONG & DEWOLFE 1959; MCINTOSH 1966; THOMSON & ALLEN 1974; TAYLOR 1977; SHOKES & MCCARTER 1979; ALI-STHAYEH & MACDONALD 1991; MACDONALD *et al.* 1994). Die Untersuchungen sind die ersten dieser Art im Bundesgebiet und schaffen eine primäre Datengrundlage. Der Weg, auf dem die Oomyceten in die Baumschulen gelangen und wie sie sich innerhalb des wasserrückführenden Systems ausbreiten, ist anhand der erhaltenen Resultate aus dem jungen Betrieb (Nr. 1) leicht nachvollziehbar. Nach nur drei Jahren Betriebsdauer, also innerhalb eines relativ kurzen Zeitraums, befanden sich *Phytophthora* spp. bereits im ablaufenden Wasser der Containerkulturflächen und waren damit in den Recyclingkreislauf eingedrungen. Der Nachweis im Teich dieser Baumschule gelang nur mit dem DAS-ELISA. Da die Abläufe den Containerkulturflächen räumlich am nächsten liegen, müssen die pilzähnlichen Mikroorganismen von hier aus, mit infizierter ausgestellter Ware, in das zirkulierende System gelangt sein. In den Baumschulen Nr. 2 und 4 wurden beispielsweise immer wieder Pflanzen mit den für *Phytophthora* typischen Welkesymptomen auf den Stellflächen gesichtet und *Phytophthora* spp. wurden mehrfach aus solchen Pflanzen isoliert. Während der Beregnung werden die Oomyceten mit dem ablaufenden überschüssigen Gießwasser oder natürlichen Niederschlägen aus den Containern in die Abläufe gespült. Vor allem handelt es sich um Sporangien und die daraus entlassenen Zoosporen, deren Bildung wasserabhängig ist. WHITESIDE & OSWALT 1973, LUTZ, MENGE & BENDER 1988, sowie MAGNANO DI SAN LIO *et al.* 1990 stellten hohe Zoosporendichten in Wasserproben unmittelbar nach der Bewässerung von *Citrus* spp. fest. *Phytophthora* spp. geraten in die Abläufe und von dort aus, das wird anhand der zahlreichen Nachweise in den seit vielen Jahren bestehenden Betrieben deutlich, dringen sie im Laufe der Zeit in die Wasserreservoirs vor. Dieser Ausbreitungsweg wird auch durch Untersuchungen in Containerversuchsanlagen in Großbritannien untermauert (PETTITT *et al.* 1998). Sind die Oomyceten erst einmal im Teich, besteht von diesem Zeitpunkt an mit jeder Entnahme von Wasser zur Beregnung der Containerware eine Übertragungs- und Infektionsgefahr durch *Phytophthora* spp..

Im Brunnenwasser sämtlicher Baumschulen wurden zu keinem Zeitpunkt *Phytophthora* spp. nachgewiesen. Dies zeigt deutlich, dass sich *Phytophthora* spp. nur innerhalb des wasserrückführenden Systems befinden. Alle vier untersuchten Baumschulen förderten Grundwasser, das bei Bedarf in die Teich eingeleitet wird. Es gelangt aber kein Überschuss- oder Recyclingwasser zurück in die Brunnen. Zudem passiert das Grundwasser verschiedene Bodenschichten, darunter auch Sand. Und die Langsamsandfiltration ist ein erfolgreiches Verfahren zur Wasserentkeimung, u.a. auch von *Phytophthora* spp. (WOHANKA 1993 ; RUNIA *et al.* 1997; VAN OS *et al.* 1998; WOHANKA 1999).

Die Teiche bieten den Oomyceten optimale Überlebens- und Entwicklungschancen. Die meisten *Phytophthora*-Arten vermögen starken Frost nicht zu überleben (KRÖBER 1980). Da die Baumschulteiche zwischen zwei und vier Meter tief sind, frieren Wasser und Sediment im Winter nicht durch und erwärmen sich im Sommer auch nicht zu sehr. Diese moderaten Temperaturen auf dem Grund bieten sowohl kälteliebenden als auch wärmeliebenden *Phytophthora*-Arten gute Überlebenschancen. Im Sediment selber bieten Nässe, z.T. anaerobe Verhältnisse und genügend organisches Material den Oomyceten gute Lebensbedingungen (OLD, OROS & MALAFANT 1984, BÄRLOCHER 1992; IPPOLITO, LIMA & NIGRO 1992). Bei mehreren *Phytophthora*-Arten wurde sogar eine erhöhte Widerstandskraft gegenüber Kälte beobachtet, wenn sie sich im organischen Material des Sediments befanden (OSTROFSKY, PRATT & ROTH 1977; OLD, OROS & MALAFANT 1984). Dies bedeutet sogar eine zusätzliche Überlebenschance bei tiefen Temperaturen für *Phytophthora* spp. in infiziertem Pflanzenmaterial, besonders in Regionen geringerer Tiefe, wie den Uferzonen der Teiche oder im Sediment der Abläufe. Die Ufer von vier der fünf beprobten Teiche waren bepflanzt, in Baumschule Nr. 4 sogar mit Rhododendron (siehe 2.4.1, Abb. 7). Abgefallene Blätter und andere Pflanzenreste, aus denen vermehrt im Laufe der Untersuchungen *Phytophthora* spp. isoliert werden konnte, schwammen auf der Wasseroberfläche.

Es wurden mehr *Phytophthora*-Arten und -Isolate im Wasser, als im Sediment gefunden. Dies hängt vermutlich mit der Wasserbewegung innerhalb der Anlagen zur Wasserrückführung zusammen. In den norddeutschen Baumschulen findet die Wasserentnahme aus den Teichen zur Beregnung der Containerware vor allem zwischen April und Oktober statt. Emittierte Zoosporen und andere *Phytophthora*-Strukturen werden von infizierten Pflanzen auf den Stellflächen mit dem überschüssigen Gießwasser über die Abläufe in die Teiche transportiert. Auf diese Weise befinden sich viele *Phytophthora*-Strukturen im Wasser. Die Konzentration dieser Strukturen im Wasser wird allerdings durch natürliche Niederschläge und nicht-kontaminiertes Wasser aus den Brunnen, das in die Teiche geleitet wird, verringert. Bei der Einleitung von Brunnenwasser wird allerdings das Sediment am Teichgrund durch den hohen Druck aufgewirbelt, so dass mit großer Wahrscheinlichkeit, *Phytophthora*-Strukturen aus dem Sediment in das Wasser gelangen.

Zwischen Herbst und Frühjahr nahm die Zahl isolierter *Phytophthora* spp. unablässig zu. Während dieser Zeit findet sowohl die Beregnung der Pflanzen, als auch die Einleitung von Brunnenwasser zur Wiederauffüllung der Wasserreservoirs selten statt. Zum Teil sind im Winter die Betriebe sogar geschlossen. Die Entwicklung von *Phytophthora* spp. in den Teichen könnte derweil durch viele Faktoren begünstigt sein. Und zwar einmal dadurch, dass keine Verdünnung durch eingeleitetes Grundwasser stattfindet und ein höherer CO₂ Gehalt aufgrund der Jahreszeit und der fehlenden Einleitung von Wasser mit hohem Druck herrscht. Die Anreicherung unsterilen Flusswassers mit CO₂ förderte z.B. die Sporulationsraten von *P. cinnamomi* (BROWN, FLACK & SWINBURNE 1981). Des Weiteren werden auch wärmeliebende Arten bei den herrschenden moderaten Temperaturen auf dem Grund an der Vermehrung nicht gehindert. Zwischen Herbst und Frühjahr werden außerdem keine

oomycetenspezifischen Fungizide ausgebracht. Und nicht zuletzt sank durch die fehlende Düngemittelzufuhr während dieser Zeit der Salzgehalt des Wassers (Daten der LWK Weser-Ems, siehe Anhang Tab. A1). *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass unterschiedliche Kationen, ebenso wie ein steigender Salzgehalt des Wassers die Beweglichkeit und Entwicklung von Zoosporen und anderen *Phytophthora*-Organen, allerdings in Abhängigkeit der *Phytophthora*-Art, hemmen kann (GISI, OERTLI & SCHWINN 1977; VON BROEMBSSEN & DEACON 1997; HILL, GRAYSON & DEACON; 1998; TOPPE & THINGGAARD 1998).

In den Wasserrecyclingsystemen der untersuchten Baumschulen war ein breites Artenspektrum vorhanden. Überraschend selten kamen die Arten *P. cactorum* und *P. cinnamomi* vor, die als Hauptschaderreger an Gehölzen in bundesdeutschen Baumschulen gelten (NIENHAUS & KIEWNIK 1998) und laut Pflanzenschutzdienst häufig isoliert werden. Auf der anderen Seite wurden Arten, wie cf. *P. richardiae*, cf. *P. undulata*, und cf. *P. gonapodyides* sowie eine neue *Phytophthora*-Art isoliert, von denen bisher nicht angenommen wurde, dass sie in bundesdeutschen Baumschulen vertreten sind. Auch THOMSON & ALLEN 1974 und ALISHTAYEH & MACDONALD 1991 isolierten überwiegend andere *Phytophthora*-Arten aus dem Bewässerungswasser von Citrusplantagen als *P. parasitica* und *P. citrophthora*, die Hauptschaderreger an *Citrus* spp., (LUTZ, MENGE & BENDER 1988; ERWIN & RIBEIRO 1996, S. 288) deren Vorkommen erwartet worden war. Ein solches Ergebnis kann mehrere Gründe haben. Zum einen erkennt der Pflanzenschutzdienst meist nur einfach zu identifizierende Arten, zu denen *P. cactorum* und *P. cinnamomi* zählen. Aus Zeitgründen wird bei anderen „schwierigeren“ Arten die Bestimmung meist nicht weiter verfolgt. Zum anderen gab es bislang noch keine Untersuchungen über das *Phytophthora*-Artenspektrum im Wasser und Sediment bundesdeutscher Baumschulen und auch aus dem Ausland liegen nur wenige Informationen darüber vor. Außerdem bedeutet eine verhältnismäßig geringe nachgewiesene Zahl bestimmter *Phytophthora*-Arten wie *P. cinnamomi* nicht, dass diese Arten nicht doch in den Betrieben verbreitet sind. Denn mit 3.000 - 6.000 m³ Fassungsvermögen eines Baumschulteichs bleibt jede genommene Probe immer eine Stichprobe.

Phytophthora-Arten kamen in den älteren Betrieben unabhängig von der Jahreszeit vor. Allerdings waren die in den Beprobungszeitraum fallenden Wintermonate 1994/95 verhältnismäßig mild, es fehlten längere Frostperioden und der Sommer war sehr warm. BRASIER & SCOTT 1994 vermuteten, dass die charakteristisch milden Winter und warmen Sommer zu Beginn der neunziger Jahre in Mitteleuropa für *Phytophthora* spp., deren Temperaturoptimum meist zwischen + 20 °C und + 30 °C liegt (KRÖBER 1985, STAMPS *et al.* 1990), sehr günstige Verbreitungs- und Etablierungsmöglichkeiten boten. Dies kann der Grund für die jahreszeitlich unabhängige Isolierung sein und bedeutet, dass in Jahren mit milden Wintern fortwährend eine Infektionsgefahr besteht. Beispielsweise überdauert die wärmeliebende Art *P. cinnamomi* in Wintern ohne längere Frostperioden (KRÖBER 1980; BENSON 1982; OLD, OROS & MALAFANT 1984).

Die Arten *P. cryptogea*, cf. *P. cryptogea* und *P. drechsleri*, cf. *P. drechsleri*, die als wärmeliebend gelten und ebenso cf. *P. gonapodyides* eine Art, die gemäßigte Temperaturen bevorzugt, wurden nicht nur im Sediment, sondern auch im Wasser das ganze Jahr über gefunden. Andere Arten wie die wärmeliebende *P. citricola*, *P. cactorum* und *P. cinnamomi* kamen nur im Sommer vor und die kälteliebenden *P. syringae* und cf. *P. undulata* wurden nur in den kühleren Monaten isoliert. Auch KLOTZ, WONG & DEWOLFE 1959 isolierten *P. citrophthora* das gesamte Jahr über aus Wasser- und Bodenproben in Citrusplantagen, fanden aber ansonsten in Abhängigkeit von der Jahreszeit ein unterschiedliches Spektrum mit kälteliebenden Arten im Winter und wärmeliebenden Arten im Sommer. HALLETT & DICK 1981 wiederum isolierten zwei *Phytophthora*-Arten ohne eindeutige jahreszeitliche Abhängigkeit aus einem See.

Die am häufigsten isolierten Arten in den untersuchten Betrieben waren *P. cryptogea*, cf. *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, cf. *P. drechsleri* und cf. *P. gonapodyides*. Wahrscheinlich haben sich gerade diese Arten Lebensbedingungen in den Wasserrecyclinganlagen besonders gut angepasst. Insbesondere die Arten *P. cryptogea* und *P. gonapodyides* gelten als ausgesprochen „aquatisch“ und wurden häufig aus Wasserproben isoliert (TAYLOR 1977; HALLETT & DICK 1981; SHEARER & LANE 1983; ALI-SHTAYEH & MACDONALD 1991). Speziell das zahlreiche Vorkommen des wasserliebenden cf. *P. gonapodyides* war in Deutschland bislang nicht bekannt. Die Identifizierung dieser Art ist aufgrund unzureichender und z.T. widersprüchlicher Beschreibungen schwierig. Es ist u.a. nicht geklärt, ob und unter welchen Umständen Oosporen, ein wichtiges taxonomisches Merkmal, gebildet werden (PITTIS & COLHOUN 1984; HANSEN & HAMM 1988; BRASIER, HAMM & HANSEN 1993). HANSEN, STREITO & DELATOUR 1999 klassifizierten jedoch ein eingesandtes Isolat mit molekularbiologischen Untersuchungen als cf. *P. gonapodyides*.

Viele der aus den Baumschulen isolierten *Phytophthora* spp. konnten nur als „confer“ bezeichnet oder gar keiner Art zugeordnet werden. Einige aus dem Wasser zweier Betriebe im Spätherbst und Winter isolierte *P. spec. nov.* gehören einer neuen Art an. Vom Erscheinungsbild ähnelt sie der ausgesprochen wärmeliebenden Art *P. palmivora*. *P. ramorum* sp. nov. hat abnorm große Chlamydosporen, ein extrem niedriges Temperaturoptimum und verursacht ein neuartiges Triebsterben an Rhododendron (WERRES & MARWITZ 1997; WERRES *et al.* 2001, im Druck). Das bedeutet, dass sich im Laufe der Jahre *Phytophthora*-Arten innerhalb dieser älteren Praxisanlagen phaenotypisch verändert haben oder sogar ein genetischer Austausch bzw. Modifikationen stattfinden. Seit kurzem werden sogenannte Species-Hybriden, entstanden durch natürliche, interspezifische Hybridisierung, wie z.B. die „*Alder-Phytophthora*“ (GIBBS 1995; BRASIER, ROSE & GIBBS 1996) beschrieben. Diese vereinen die Bestimmungsmerkmale verschiedener Arten in sich und können nicht eindeutig zugeordnet werden (BRASIER 1997; MAN IN'T VELD *et al.* 1998; BRASIER, COOKE & DUNCAN 1999). Das die vielen nicht bestimmbaren Isolate aus den Untersuchungen auch solche Hybriden sind, wäre eine Erklärung. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Behandlung von Containerware mit oomycetenspezifischen Fungiziden über die Jahre

Ursache solcher Veränderungen ist, da die *Phytophthora*-Arten zunehmend unempfindlicher gegenüber den Wirkstoffen sind (COFFEY, KLURE & BOWER 1984; COFFEY & JOSEPH 1985; KATO *et al.* 1990; TIMMER, GRAHAM & ZITKO 1997).

Für die Baumschuler ist die Frage nach der Pathogenität der isolierten *Phytophthora* spp. und in welche Mengen sie eine Gefahr darstellen ausschlaggebend. Nahezu alle der in den vier Betrieben isolierten *Phytophthora*-Arten sind Primärpathogene an Gehölzen (ERWIN & RIBEIRO 1996). Obwohl *Phytophthora*-Arten als pathogen gelten (TSAO 1990; ERWIN & RIBEIRO 1996, S. 1-7), ist die Pathogenität von *P. gonapodyides* und *P. undulata*, die ebenfalls aus den Praxisproben isoliert wurden, umstritten (BRASIER, HAMM & HANSEN 1993). *P. undulata* wurde von der Gattung *Pythium* in die Gattung *Phytophthora* transferiert und ist nur unzureichend beschrieben (DICK 1989). Beide Arten stehen allerdings im Verdacht, im Zusammenspiel mit anderen *Phytophthora*-Arten Schäden an Eichen zu verursachen (JUNG, BLASCHKE & NEUMANN 1996; JUNG 1998). Pathogenität kann weiterhin vom Isolat selber und von der Herkunft (Wirt) abhängen. Offenkundig stammen die meisten *Phytophthora*-Isolate aus den Wasser- und Sedimentproben von den Gehölzpflanzen auf den Stellflächen. Mit Hilfe des Rhododendronblatt-Tests konnte gezeigt werden, dass alle Isolate virulent sind. Denn nur solche Isolate können die gesunden Blätter infizieren und das unverletzte Blattgewebe besiedeln.

Die Untersuchung der Wasser- und Sedimentproben aus den Betrieben war qualitativ, nicht quantitativ. So kann beispielsweise nichts darüber gesagt werden, wie viele von welcher *Phytophthora*-Struktur in den einzelnen Proben zu jedem Zeitpunkt vorhanden waren. Aufgrund der Ergebnisse mit dem Rhododendronblatt-Test ist es sehr wahrscheinlich, dass in den Wasserproben vor allem Zoosporen schwammen. Über Schadensschwellen von *Phytophthora* spp. gibt es nur wenige konkrete und sehr widersprüchliche Angaben. Nach KOLB 1986 genügen bereits fünf Zoosporen für die erfolgreiche Infizierung einer Pflanze. BRUCK & KENERLY 1983, betonen, dass bereits 0,01 *Phytophthora*-Einheiten pro Gramm Boden für eine erfolgreiche Infektion mit *P. cinnamomi* an *Abies fraseri* ausreichen. MAGNANO DI SAN LIO *et al.* 1990 und LUTZ & MENGE 1991 dagegen geben mit 15-20 *P. citrophthora*, bzw. *P. parasitica* Organen pro Gramm Boden als noch tolerierbaren Grenzwert einen weitaus höheren Schwellenwert an. Es ist offensichtlich, dass es keinen einheitlichen Schwellenwert geben kann. Unter anderem hängt er von der *Phytophthora*-Art, der Wirtspflanze und davon ab, ob Boden oder Wasser untersucht wird. Prinzipiell stellt jede nachgewiesene *Phytophthora*-Struktur innerhalb des Wasserkreislaufs ein Infektionsrisiko dar. Denn die Überlebensstrategien der Oomyceten sind vielfältig. So dienen beispielsweise neben den Oosporen heterothallischen *Phytophthora*-Arten dickwandige Chlamydosporen als Überdauerungsform (HENDRIX & KUHLMAN 1965b, COTHER & GRIFFIN 1973, SHEW & BENSON 1982, BRUCK & KENERLY 1983; LUTZ & MENGE 1986; MAGNANO DI SAN LIO *et al.* 1990; BARNARD & MITCHELL 1993). Zoosporen waren im Wasser mehr als einen Monat lebensfähig (ANONYMUS 1981). Und sogar encystierte Zoosporen waren in der Lage im trockenen Boden

zu überdauern und bei Wiedervernässung erneut mit einer Zoospore auszukeimen (DUNIWAY & GORDON 1986). Dies bedeutet sogar eine zweite Chance für eine Infektion.

Die Untersuchungen zeigen, dass *Phytophthora* spp. durch die Wiederverwendung des Gießwassers in jeder Baumschule übertragen wird. Die steigende Zahl isolierter *Phytophthora* spp. macht deutlich, dass die Oomyceten sich schnell innerhalb solcher Anlagen ausbreiten und etablieren können, da sie in diesen ideale Lebensbedingungen vorfinden.

4.3 Schlußbetrachtung und Perspektiven

Nachdem in den Untersuchungen eine relativ hohe Kontaminierung von Praxisbetrieben mit *Phytophthora* spp. festgestellt wurde, stellt sich automatisch die Frage nach sinnvollen Maßnahmen, die zu einer Verringerung des Eintrags und der Ausbreitung dieser Pathogene führen. Die Ergebnisse der epidemiologischen Untersuchungen liefern deutliche Hinweise, wie das Eindringen, die Verbreitung und Etablierung von *Phytophthora* spp. innerhalb des Recyclingkreislaufts verhindert werden kann.

Wege zur Bekämpfung von *Phytophthora* spp. in den sehr unterschiedlich aufgebauten Containeranlagen der Praxisbetriebe im Rahmen des integrierten Pflanzenschutzes gibt es bislang noch nicht. Heute steht vor allem eine umweltschonende Produktion von Containerpflanzen im Vordergrund, wozu die Vermeidung eines übermäßigen Einsatzes von chemischen Pflanzenschutzmitteln gehört. Gerade aber in der Jungpflanzenanzucht ist der massive prophylaktische Einsatz von Fungiziden gebräuchlich (HOITINK & POWELL 1990; MAGNANO DI SAN LIO *et al.* 1990). Der Einsatz von Fungiziden gegen *Phytophthora*-Arten birgt allerdings eine Reihe von Gefahren. Resistenzen, vor allem gegenüber Metalaxyl sind bekannt (COFFEY, KLURE & BOWER 1984; SEEMÜLLER & SUN 1989; KATO *et al.* 1990; DANIELL & FALK 1994; TIMMER, GRAHAM & ZITKO 1997). Und auch bei Al-Fosethyl sind dahingehende Tendenzen beobachtet worden (VEGH *et al.* 1985; COFFEY & JOSEPH 1985). Der in den Untersuchungen extrem häufig im Teichwasser nachgewiesene cf. *P. gonapodyides* zeigt eine geringe Empfindlichkeit gegenüber Metalaxyl (KATO *et al.* 1990). Das legt den Verdacht nahe, dass der Einsatz dieses Pflanzenschutzmittels in den Baumschulen die Ausbreitung gerade dieser Art gefördert hat. Möglicherweise sind auch andere häufig isolierte Arten, wie z.B. *P. cryptogea* oder *P. drechsleri* nicht sehr empfindlich. Aus diesen Gründen sind Überlegungen, z.B. Pflanzenschutzmittel in die Teiche zu geben oder dem Bewässerungswasser beizumengen (CSINOS, JOHNSON & GOLDEN 1986), wie es z.T. im Unter-Glas Bereich praxisüblich ist, vor dem Hintergrund des integrierten Pflanzenschutzes nicht vertretbar und riskant.

Mangelnde Hygiene und falsche Kulturmaßnahmen aus Unkenntnis der Lebensbedingungen der Erreger sind die Hauptursachen für die Verbreitung von *Phytophthora* spp. innerhalb der Betriebe. Schon einfache Vorkehrungen würden den Erregern geringere Überlebenschancen in den Baumschulen bieten. So sollte beispielsweise alles, was ihnen als

saprophytische Nische dient, vermieden und entfernt werden. Dazu gehören Substrat- und Pflanzenreste auf den Kulturf lächen, aber auch Pflanzen mit *Phytophthora* spp. verdächtigen Symptomen. Des weiteren ist ein regelmäßiger Austausch der Bändchengewebe, also der obersten Schicht der Kulturf lächen zu empfehlen, da sich mit der Zeit kleine Pflanzenpartikel in den Zwischenräumen festsetzen, die als Überlebensnischen dienen können. In jedem Falle aber ist eine Uferbepflanzung der Bewässerungsteiche mit Wirtspflanzen von *Phytophthora* spp., besonders mit den für das Ammerland typischen und für viele *Phytophthora*-Arten empfindlichen *Rhododendron* spp. wie in Betrieb Nr. 4, zu vermeiden. Jeglicher Eintrag von Pflanzenteilchen stellt eine zusätzliche Infektionsquelle dar. Deshalb ist ein konsequentes Monitoring der Containerkulturf lächen unter Berücksichtigung strengster Hygiene notwendig.

Eine weitere prophylaktische Möglichkeit wäre auch der Zusatz von Rindenmaterial zum Substrat von Containerkulturen. Die phytosanitären Eigenschaften von Rindensubstraten wurden bereits mehrfach nachgewiesen (BENSON, JONES & DAUGHTRY 1978; HOITINK, VAN DOREN & SCHMITTHENNER 1977; HARDY & SIVASITHAMPARAM 1991; OWNLEY & BENSON 1991).

Besonders das in den älteren Teichen entstandene Sediment birgt ein fortwährendes Infektionspotential. Ein Entfernen und Entsorgen des Sediments wäre bei den künstlich angelegten Folienteichen möglich. Dies empfiehlt übrigens auch der Hersteller der Folien, allerdings zur Beseitigung auftretender Algen (AVERDIECK *et al.* 1996). Bei den Naturteichen, deren Untergrund durch z.B. Lehmschichten abgedichtet ist, könnte man nach der Saison, zu Beginn des Winters, das Wasser in Gräben oder andere Reservoirs umpumpen. Dadurch würde der Frost den Teichgrund erreichen. Da davon ausgegangen werden kann, dass die meisten *Phytophthora*-Arten längere Zeiträume mit Temperaturen unter 0 °C nicht überleben können (KRÖBER 1980), würden deren Chancen und damit das Erregerpotential mit jedem Frosttag sinken.

Die Entwicklung von Systemen zur kontinuierlichen Beseitigung pflanzenpathogener Organismen aus dem wiederverwendeten Gießwasser beschränkt sich bislang auf den Unter-Glas-Bereich, wie NFT- (*nutrient film technique*), Fließbrinnen- oder Ebbe/Flut-Systeme (GERLACH 1998). Zum Einsatz kommen dabei UV-Bestrahlung, Chlorierung, Ozonierung, Erhitzen und Filtrationsverfahren mit Sand, Mikrofiltern oder Lava (ANONYMUS 1996). Nicht alle diese Methoden würden sich zur Beseitigung von *Phytophthora* spp. aus Bewässerungswasser eignen. So förderte z.B. die UV-Bestrahlung bei *P. capsici* die rasche Ausbildung von Metalaxyl-resistenten Isolat (BRUIN & EDINGTON 1982). Außerdem lassen sich die meisten Verfahren nicht ohne weiteres auf die Verhältnisse im Freiland übertragen. Die für die in den Freilandquartieren anfallenden Wassermengen erforderliche Förderleistung von Pumpen wäre z.B. um ein Vielfaches größer als im Unter-Glas-Bereich. Nicht zuletzt spielen auch die Kosten eine entscheidende Rolle. Probleme gerade im Ammerland könnten die hohen Eisenwerte im zur Bewässerung genutzten Grundwasser aus betriebseigenen Brunnen bereiten, die zum schnellen Verstopfen der Tropfer führen (WILHELM 1996; DIENER

pers. Mitteilung). Am vielversprechendsten für den Einsatz in Baumschulen ist die Langsandsandfiltration mit der u.a. *Phytophthora* spp. erfolgreich aus Bewässerungswasser eliminiert werden konnte (WOHANKA 1990; VAN KUIK 1992; WOHANKA 1993; BEHRENDTS 1994; RUNIA *et al.* 1997; WOHANKA & HELLE 1997; JAMART & VAN LAERE 1998; VAN OS *et al.* 1998; WILSON, VON BROEMBSSEN & ANDREWS 1998, WOHANKA 1999). Indes muss die Filterkapazität für die in den Baumschulquartieren anfallenden Wassermengen, die bis zu 10.000 m³ pro ha und Saison betragen können (DIETZ & BEHRENDTS 1994), noch gesteigert werden. Zweitens wäre zu überlegen, ob es nicht vorteilhafter ist, das Wasser vor der Einleitung in den Teich zu filtern, und nicht hinterher, wie normalerweise üblich. Denn dadurch gelangen Pflanzenreste, Substrat und *Phytophthora*-Strukturen mit dem Überschusswasser erst gar nicht in die Teiche und lagern sich als Sediment ab. Schließlich wurden im Teich der jungen Baumschule ohne Sediment nur zweimal *Phytophthora* spp. nachgewiesen.

Neu ist der Vorschlag, zur Entkeimung die Uferzonen der Bewässerungsteiche in Baumschulen mit Repositionspflanzen zu bepflanzen (RANGE 1992; WITT 1997). Es handelt sich vor allem um *Carex*- und *Phragmites*-Arten, die hohe Wurzeldichten haben und den bakteriellen Abbau sowie die Umwandlung des Nährstoffeintrags in organische Masse in Pflanzenkläranlagen fördern (ROOS & BEHRENS 1994; SEITZ 1995). Die phytosanitäre Wirkung solcher Pflanzen ist jedoch zweifelhaft und unbewiesen. In einer der älteren beprobten Baumschulen bestand sogar seit geraumer Zeit eine solche Repositionsbepflanzung (Teich 3A), ohne dass das Vorkommen von *Phytophthora* spp. gegenüber anderen untersuchten Teichen geringer war. Sinn und Zweck solcher Pflanzenkläranlagen in Baumschulen mit Containerkulturflächen bleiben umstritten (LÜTTMANN 1998).

Ein eher langfristiger, aber sinnvoller Ansatz zur Bekämpfung wäre die konsequente Testung der Baumschulsortimente im Hinblick auf Resistenzen gegenüber *Phytophthora* spp., wie sie ansatzweise schon in den USA gemacht wurden (HOITINK & SCHMITTHENNER 1974, BENSON & COCHRAN 1980) und der Verzicht der Kultivierung für *Phytophthora* spp. extrem anfälliger Sorten wie die in den norddeutschen Baumschulen weit verbreitete *Chamaecyparis lawsoniana* cv. Ellwoodii.

Abschließend ist festzuhalten, dass mit den vorliegenden Untersuchungen erstmalig in der BRD konkrete Daten über das Vorkommen von *Phytophthora* spp. in Praxisbetrieben mit Containerkulturflächen mit Wasserrückführung vorliegen. Die Erkenntnisse bieten eine Diskussionsgrundlage, auf der Praktiker zusammen mit Fachleuten geeignete Maßnahmen zur Verhinderung einer fortgesetzten Ausbreitung bzw. Etablierung und Bekämpfung der Oomyceten in den Anlagen und auch weitergehende Untersuchungen erörtern sollten.

5 Zusammenfassung

Aufgrund ökologischer und ökonomischer Vorteile haben sich in den niedersächsischen Baumschulen Containerkulturf lächen mit Wasserrückführung zunehmend etabliert. Das Wasserrecycling birgt allerdings auch das Risiko der Übertragung und Verbreitung wirtschaftlich bedeutender Schaderreger wie die dem Leben im Wasser sehr gut angepassten *Phytophthora*-Arten. Untersuchungen zum Nachweis der Oomyceten in Wasser- und Sedimentproben bundesdeutscher Praxisbetriebe gab es bislang nicht.

Zur Empfehlung eines Testverfahrens für die Pflanzenschutzämter wurden unterschiedliche Nachweismethoden zunächst unter kontrollierten, später unter Praxisbedingungen geprüft und miteinander verglichen. Die Ergebnisse variierten stark. Elementare Bedeutung hatte daher die eingehende Prüfung der Methoden unter Praxisbedingungen. Ausgewählt wurden mikrobiologische Verfahren, drei Ködermethoden (Apfel, Lupinensämlinge, Rhododendronblätter) und der DAS-ELISA mit zwei polyklonalen Antisera. Die Spezifität und Sensitivität gegenüber *Phytophthora* spp. *in vitro* wurde untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass ein erfolgreicher Nachweis sowohl von der untersuchten *Phytophthora*-Art, der Menge und der Form, in der *Phytophthora* vorlag, abhing. Anschließend erfolgte die Testung auf den Nachweis der Oomyceten in Wasser und Sedimentproben aus Wasserrecyclingsystemen. Dazu wurden über ein Jahr lang, zwischen August und Juli, von vier verschiedenen Baumschulen im Ammerland Proben aus Abläufen, Teichen und Brunnen genommen. Mit Ausnahme der mikrobiologischen Verfahren konnten mit allen Methoden *Phytophthora* spp. in den vier Baumschulen detektiert werden. In den meisten Fällen wurden die Nachweisraten stärker durch die Methode an sich beeinflusst, als durch Faktoren, die charakteristisch für Baumschulbetriebe sind. Beim Vergleich der mikrobiologischen Verfahren mit den drei Ködermethoden, wies der Rhododendronblatt-Test das weiteste Spektrum an *Phytophthora*-Arten in den Praxisproben nach. Insgesamt war der Rhododendronblatt-Test die erfolgreichste Nachweismethode, gefolgt von dem ELISA mit dem gegen *P. cinnamomi* gerichteten Antiserum.

Phytophthora spp. wurden im Wasserrecyclingsystem aller vier untersuchten Betriebe erfolgreich nachgewiesen. Während in den älteren Betrieben *Phytophthora* spp. in den Abläufen und in den Teichen detektiert werden konnte, waren sie in der jüngsten Baumschule mit dem neuen Recyclingsystem nur in den Abläufen präsent. Im Teich dieser Baumschule konnte *Phytophthora* spp. mit den meisten Methoden nicht nachgewiesen werden. Sämtliche Wasserproben aus den Brunnen waren nicht kontaminiert. *Phytophthora* spp. befanden sich sowohl in den Wasser- als auch in den Sedimentproben. Der Nachweis von *Phytophthora* spp. in den Wasserrecyclingsystemen erfolgte unabhängig von der Jahreszeit. Das zum jeweiligen Zeitpunkt isolierte Artenspektrum variierte jedoch. Die Anzahl der Isolate stieg zwischen dem Spätherbst und dem Frühjahr stark an. Insgesamt wurden 12 verschiedene *Phytophthora*-Arten inklusive einer neuen Art, sowie weitere unbekannte Arten in den Baumschulen nachgewiesen.

6 Literatur

- ADGEN DIAGNOSTIC SYSTEMS 1995. Phytophthora (and Pythium) water sampling kit. Technical Booklet; ADGEN DIAGNOSTIC SYSTEMS, Watson Peat Building, Auchincruive, Ayr KA6 5HW, Scotland
- ALI-SHTAYEH, M.S. & MACDONALD, J.D. 1991. Occurrence of Phytophthora species in irrigation water in the Nablus area (West Bank of Jordan). *Phytopathologia mediterranea* **30**, 143-150
- ALI-SHTAYEH, M.S., MACDONALD, J.D. & KABASHIMA, J. 1991. A method for using commercial ELISA tests to detect zoospores of Phytophthora and Pythium species in irrigation water. *Plant Disease* **75**, 305-311
- ANONYMUS, 1981. *Phytophthora cinnamomi* – root rot. Annual Report of the Director General: Agriculture and Fisheries of the period 1. April 1980 to 31. March 1981- Reports South Africa
- ANONYMUS, 1996. Schützt der Lavafilter vor Krankheiten in der Nährlösung? *Groenten en Fruit/Glasgroenten* 13.12.96, M.K.
- ATKINSON, R.G. 1965. Automatic Drip-Watering Systems For Inducing Infection Of Potted Plants By Root Rot Of Phytophthora Species. *Canadian Journal of Plant Science*, Volume **45**, 609-611
- ATMATJIDOU, V.P., FYNN, R.P. & HOITINK, H.A.J. 1991. Dissemination and Transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae* in an Ebb and Flow Irrigation System. *Plant Disease* **75**, 1261-1265
- AVERDIECK, H., HELLE, M., MACKROTH, K., REUTER, C., ULSAMER, P. & WILHELM, E. 1996. Blickpunkt Bewässerung: Impulsgießwagen - Wassersammelbecken - Topfpflanzenbewässerung im geschlossenen System. *ZVG Gartenbau-Report* **22**, Jhg. 9/96, 12-25
- BACKHAUS, G.F. 1989. Untersuchungen zur Verbreitung phytopathogener bodenbürtiger Mikroorganismen in wiederverwendbarem Gießwasser in geschlossenen Kultursystemen. *Pflanzenschutz Versuchsergebnisse der Landwirtschaftskammer Weser-Ems* 1989, Pflanzenschutzamt Oldenburg, 400-411
- BACKHAUS, G.F., HÄRIG, R. & HEMJOLTMANN, E. 1990. Zum Risiko der Verbreitung von Krankheitserregern am Beispiel eines geschlossenen Kultursystems mit Eriken. *TASPO-Praxis* **18**, 62-71
- BÄRLOCHER, F. (ED.) 1992. The ecology of aquatic hyphomycetes. Springer-Verlag
- BARNARD, E.L. & MITCHELL, D.J. 1993. Phytophthora basal canker of red maple. *Plant Pathology Circular No.* **361**, September/October; Fla. Dept. Agriculture & Consumer Services, Division of Plant Industry
- BÄRTELS, A. 1995. Der Baumschulbetrieb. Verlag Eugen Ulmer, 4. Auflage, Stuttgart 1995
- BEHREND, V. 1994. Cleaning of recirculating and surplus water in container plant production. *International Plant Propagators' Society Combined Proceedings Vol.* **44**, 11-15
- BEHREND, V., KEMP, J. & WOHANKA, W. 1992. Wasser wiederverwenden trotz Pilz-Gefahr. *Deutsche Baumschule* **7**, 310-312

- BENSON, D.M. 1982. Cold inactivation of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* **72**, 560-563
- BENSON, D.M. 1991. Detection of *Phytophthora cinnamomi* in Azalea with Commercial Serological Assay Kits. *Plant Disease* **75**, 478-482
- BENSON, D.M. & COCHRAN, F.D. 1980. Resistance of evergreen hybrid azaleas to root rot caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Disease* **64**, 214-215
- BENSON, D.M. & JONES, R.K. 1980. Etiology of Rhododendron dieback caused by four species of *Phytophthora*. *Plant Disease* **64**, 687-691
- BENSON, D.M. & CAMPBELL, C. LEE 1985. Spatial pattern of *Phytophthora* root rot and dieback of azalea in container-grown nursery stock. *Plant Disease* **69**, 1049-1054
- BENSON, D.M., JONES, R.K. & DAUGHTRY, B.I. 1978. Ground covers that restrict disease spread. *American Nurseryman* August 15, 142-144
- BENSON, D.M., JONES, R.K. & BARKER, K.R. 1982. Disease loss assessment for Azalea, Rhododendron, and Japanese Holly in North Carolina nurseries. *Plant Disease* **66**, 125-128
- BERKELMANN, B., WOHANKA, W. & KRCZAL, G. 1994. Pelargonium-Virus breitet sich im geschlossenen Kultursystem aus. *TASPO Gartenbaumagazin* **11**, 10-12
- BOLAY, A. 1994. Les dépérissement des arbres fruitiers dus à des champignons du genre *Phytophthora* en Suisse romande et au Tessin. *Revue suisse Viticulture, Arboriculture, Horticulture* Volume **26** (3), 149-156
- BONANTS, P., HAGENAAR-DE WEERDT, M., GENT-PELZER VAN, M., LACOURT, I., COOKE, D. & DUNCAN, J. 1997. Detection and identification of *Phytophthora fragariae* Hickman by the polymerase chain reaction. *European Journal of Plant Pathology* **103**, 345-355
- BRASIER, C.M. 1997. Fungal species in practice: identifying species units in fungi. In: CLARIDGE, M.F.; DAWAH, H.A. & WILSON, M.R. (ed.): *Species : The Units of Biodiversity*. Chapman & Hall, ISBN 0 412 63120 2, Chapter 7, 135-170
- BRASIER, C.M. & SCOTT, J.K. 1994. European oak declines and global warming: a theoretical assessment with special reference to the activity of *Phytophthora cinnamomi*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **24**, 221-232
- BRASIER, C.M., HAMM, P.B. & HANSEN, E.M. 1993. Cultural characters, protein patterns and unusual mating behaviour of *Phytophthora gonapodyides* isolates from Britain and North America. *Mycological Research* **97** (11), 1287-1298
- BRASIER, C.M., ROSE, J. & GIBBS, J.N. 1996. An unusual *Phytophthora* associated with wide-spread alder mortality in Britain. *Plant Pathology* **44**, 999-1007
- BRASIER, C.M., COOKE, D.E. & DUNCAN, J.M. 1999. Origin of a new *Phytophthora* pathogen through interspecific hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Volume **96**, 5878-5883
- BRIELMAIER-LIEBETANZ, U. & SADOWSKA-RYBAK, M. 1994. Vergleich von Antiseren zum Nachweis von *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* im enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, **46** (2), Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart, 37-40.

- BROEMBSSEN VON, S.L. 1984a. Occurrence of *Phytophthora cinnamomi* on indigenous and exotic hosts in South Africa, with special reference to the South Western Cape Province. *Phytophylactica* **16**, 221-225
- BROEMBSSEN VON, S.L. 1984b. Distribution of *Phytophthora cinnamomi* in rivers of the South Western Cape Province in South Africa. *Phytophylactica* **16**, 227-229
- BROEMBSSEN VON, S.L. & DEACON, J.W. 1997. Calcium Interference with Zoospore Biology and Infectivity of *Phytophthora parasitica* in Nutrient Irrigation Solutions. *Phytopathology* **87** (5), 522-528
- BROWN, A.E., FLACK, N.J. & SWINBURNE, T.R. 1981. Factors influencing sporangial formation by *Phytophthora cinnamomi*. *Record of Agricultural Research* **29**, 85-89
- BRUCK, R.I. & KENERLY, C.M. 1983. Effects of metalaxyl on *Phytophthora cinnamomi* root rot of *Abies fraseri*. *Plant Disease* **67**, 688-690
- BRUIN, G.C.A. & EDINGTON, L.V. 1982. Induction of fungal resistance to metalaxyl by ultra-violet irradiation. *Phytopathology* **72**, 476-480
- BÜTTNER, C. 1996. Virusübertragung durch die Nährlösung. *Deutscher Gartenbau* **20**, 1170
- CACCIOLA, S.O., PENNISI, A.M. & MAGNANO DI SAN LIO, G. 1995. Evaluation of a commercial ELISA kit for the detection of *Phytophthora* spp. in plant tissues and soil. *Bulletin OILB srop: IOBC wprs bulletin; Antibes (France)*, v. **18** (5), 188-195
- CAHILL, D.M. & HARDHAM, A.R. 1993. A Dipstick-Immunoassay for the specific detection of *Phytophthora cinnamomi* in soils. 6th International Congress of Plant Pathology July/28-August/6; Montréal, Canada
- CAHILL, D.M. & HARDHAM, A.R. 1994. Exploitation of zoospore taxis in the development of a novel Dipstick Immunoassay for the specific detection of *Phytophthora cinnamomi* *Phytopathology* **84**, 193-200
- CAMPBELL, W.A. 1949. A method of isolating *Phytophthora cinnamomi* directly from soil *Plant Disease Reporter* **33**, 134-135
- CASPER, R. & MEYER, S. 1981. Die Anwendung des ELISA-Verfahrens zum Nachweis phytopathogener Viren. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* **33** (2), 49-54
- CHEE, K.H. & NEWHOOK, F.J. 1965. Improved methods for use in studies on *Phytophthora cinnamomi* and other *Phytophthora* species. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **8**, 88-95
- CLARK, M.F. & ADAMS, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. *Journal of general Virology* **34**, 475-483
- COFFEY, M.D. & JOSEPH, M.C. 1985. Effects of phosphorous acid and fosethyl-Al on the life cycle of *Phytophthora cinnamomi* and *P. citricola*. *Phytopathology* **75**, 1042-1046
- COFFEY, M.D., KLURE, L.J. & BOWER, L.A. 1984. Variability in sensitivity to metalaxyl of isolates of *Phytophthora cinnamomi* and *Phytophthora citricola*. *Phytopathology* **74**, 417-422
- CONVERSE, R. & MARTIN, R. 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) – viruses. In: HAMPTON, R., BALL, E., BOER, S. DE (ed.); *Serological methods for detection and*

- identification of viral and bacterial plant pathogens: APS Press, American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota USA, 179-197
- COOKE, D., WILLIAMS, N. & DUNCAN, J.M. 1996/1997. The uses of ITS regions in *Phytophthora* species. Annual Report of the Scottish Crop Research Institute, Dundee, 151-154
- COOKE, D.E.L., DRENTH, A., DUNCAN, J.M., WAGELS, G. & BRASIER, C.M. 2000. A molecular Phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. Fungal Genetics and Biology **30**, 17-32
- COPE, M. & HARDHAM, A.R. 1994. Synthesis and assembly of flagellar surface antigens during zoosporegenesis in *Phytophthora cinnamomi*. Protoplasma **180**, 158-168
- COTHER, E.J. & GRIFFIN, D.M. 1973. Formation of chlamydospores by *Phytophthora drechsleri*. Transactions of the British Mycological Society **61** (2), 379-402
- CSINOS, A.S., JOHNSON, A.W. & GOLDEN, A.M. 1986. Metalaxyl and Fenamiphos applied through Irrigation Water to control Black Shank / Root-Knot Complex on Tobacco. Plant Disease **70**, 210-213
- DANCE, M.H., NEWHOOK, F.J. & COLE, J.S. 1975. Bioassay of *Phytophthora* spp. in soil. Plant Disease Reporter **59** (6), 523-527
- DANIELL, I.R. & FALK, C.L. 1994. Economic comparison of *Phytophthora* root rot control methods. Crop Protection **13** (5), 331-336
- DARVAS, J.M. & KOTZÉ, J.M. 1982. Disease Potential and Success of Recovery of *Phytophthora cinnamomi* with a Lupine Seedling Bait Technique in Relation to the Severity of Avocado Root Rot Symptoms. Phytophthora Newsletter **10**, 9-10
- DICK, M.W. 1989. *Phytophthora undulata* comb. nov. Mycotaxon **35**, 449-453
- DIETZ, D. & BEHREND, V. 1994. Wasserverbrauch optimieren. Deutscher Gartenbau **50**, 2984-2987
- DUNIWAY, J.M. & GORDON, T.R. 1986. Water relations and pathogen activity in soil. British Mycological Symposium **11**, 119-137
- ECKERT, J.W. & TSAO, P.H. 1962. A selective antibiotic medium for isolation of *Phytophthora* and *Pythium* from plant roots. Phytopathology **52**, 771-779
- ERWIN, D.C. & RIBEIRO, O.K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota 55121, USA
- GABOR, B.K., O'GARA, E.T., PHILIP, B.A., HORAN, D.P. & HARDHAM, A.R. 1993. Specificities of monoclonal antibodies to *Phytophthora cinnamomi* in two rapid diagnostic assays. Plant Disease **77**, 1189-1197
- GABLER, J. 1995. Detection of *Phytophthora nicotinae* in *Nicotiana* spp. by indirect ELISA - first results. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin **25**, 133-135
- GERLACH, A. 1998. Die Wiederverwertung des Drainagewassers macht Desinfektion zu einem Muß. GRODANIA A/S, Hovedgaden 501, DK-2640 Hedehusene, Denmark; GRODAN-Kulturservice, Allgemeines Kultur-Info Nr. 3 - Mai 1998, 1-4
- GERRETSON-CORNELL, L. 1976. Effect of different methods of water demineralization on the recovery of *Phytophthora cinnamomi* Rands by lupin baiting. Phytion **34** (2), 85-88

- GERRETSON-CORNELL, L. 1994. A compendium and classification of the species of the genus *Phytophthora* De Bary by the canons of the traditional taxonomy. Research Division, State Forests of New South Wales Sydney. Technical Paper No. **45**
- GIBBS, J.N. 1995. *Phytophthora* root disease of alder in Britain. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin **25**, 661-664
- GISI, U., OERTLI, J.J. & SCHWINN, F.J. 1977. Water and salt relations of sporangia of *P. cactorum* (Leb. & Cohn) Schroet. in vitro. Phytopathologische Zeitschrift **89** (3), 261-284
- GRIMM, G.R. & ALEXANDER, A.F. 1973. Citrus leaf pieces as traps for *Phytophthora parasitica* from soil slurries. Phytopathology **63**, 540-541
- HAHN, R. & WERRES, S. 1997. Development of a dot Immunobinding assay to detect *Phytophthora* spp. in naturally dark-rooted woody plants. Annales of Applied Biology **130**, 453-466
- HALLETT, I.C. & DICK, M.W. 1981. Seasonal and diurnal fluctuations of oomycete propagule numbers in the free water of a freshwater lake. Journal of Ecology **69**, 671-692
- HANSEN, E.M. & HAMM, P.B. 1988. *Phytophthora drechsleri* in remote areas of Southeast Alaska. Transactions of the British Mycological Society **91** (3), 379-384
- HANSEN, E.M., STREITO, J-C. & DELATOUR, C. 1999. First Confirmation of *Phytophthora lateralis* in Europe. Plant Disease **83** (6), 587
- HANSEN, E.M, HAMM, P.B., JULIS, A.J. & ROTH, L.F. 1979. Isolation, incidence and management of *Phytophthora* in forest tree Nurseries in the Pacific Northwest. Plant Disease Reporter **63**, 607-611
- HANSELMANN, E. 1991. Geschlossener Wasserkreislauf bei Containerkultur in einer Baumschule. TASPO Magazin September, 14-16
- HARDY, G.E.ST.J. & SIVASITHAMPARAM, K. 1991. Effects of sterile and non-sterile leachates extracted from composted eucalyptus bark and pine-bark container media on *Phytophthora* spp. Soil Biology and Biochemistry, Vol. **23**, No. 1, 25-30
- HÄRIG, R. & BACKHAUS, G.F. 1990. Phytopathogene Bodenpilze in wiederverwendetem Gießwasser. Gartenbauwissenschaft **90** (6), 260-265
- HENDRIX, F.F.JR. & KUHLMAN, E.G. 1965a. Factors affecting direct recovery of *Phytophthora cinnamomi* from soil. Phytopathology **55**, 1183-1187
- HENDRIX, F.F.JR. & KUHLMAN, E.G. 1965b. Existence of *Phytophthora cinnamomi* as chlamydospores in soil. Reports and Abstracts of the 1965 Annual Meeting of the Southern Division of the American Phytopathological Society, Dallas, Texas 1.-3. Feb.1965, 499
- HILL, A.E., GRAYSON, D.E. & DEACON, J.W. 1998. Suppressed germination and early death of *Phytophthora infestans* sporangia caused by pectin, inorganic phosphate, ion chelators and calcium-modulating treatments. European Journal of Plant Pathology **104**, 367-376
- HOITINK, H.A.J. & SCHMITTHENNER, A.F. 1974. Relative Prevalence and Virulence of *Phytophthora* species Involved in Rhododendron Root Rot. Phytopathology **64**, 1371-1374

- HOITINK, H.A.J. & POWELL, C.C. JR. 1990. Fighting *Phytophthora*. American Nurseryman, May 15, 67-71
- HOITINK, H.A.J., VAN DOREN, D.M. & SCHMITTHENNER, A.F. 1977. Supression of *Phytophthora cinnamomi* in a composited hardwood bark potting medium. Phytopathology **67**, 561-565
- IPPOLITO, A., LIMA, G. & NIGRO, F. 1992. Influence of irrigation method on *Phytophthora* root rot of Citrus, preliminary results. Phytopathologia mediteranea **31** (3), 170-174
- JAMART, G. & LAERE VAN, S. 1998. The slow sand filter as a biological water desinfectant. The how and why of insiste in horticulture. Verbondsnieuws **42** (14), 35-37
- JEFFERS, S.N. & MARTIN, S.B. 1986. Comparison of Two Media Selective for *Phytophthora* and *Pythium* Species. Plant Disease **70**, 1038-1043
- JENKINS JR., S.F. & AVERRE, C.W. 1983. Root Diseases of Vegetables in Hydroponic Culture Systems in North Carolina Greenhouses. Plant Disease **67**, 968-970
- JUNG, T. 1998. Die Phytophthora-Erkrankung der europäischen Eichenarten - wurzelzerstörende Pilze als Ursache des Eichensterbens. Dissertation der TU München. LINCOM Studien zur Forstwissenschaft 02, LINCOM EUROPA, ISBN 3-89586-084-0
- JUNG, T. , BLASCHKE, H. & NEUMANN, P. 1996. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. European Journal of Forest Pathology **26**, 253-272
- KATO, S., COE, R., NEW, L. & DICK, M.W. 1990. Sensitivities of various Oomycetes to hymexazol and metalaxyl. Journal of general Microbiology **136**, 2127-2134
- KLIEJUNAS, J.T. & KO, W.H. 1976. Dispersal of *Phytophthora cinnamomi* on the Island of Hawaii. Phytopathology **66**, 457-460
- KLOTZ, L.J., WONG, PO-PING & DEWOLFE, T.A. 1959. Survey of irrigation water for the presence of *Phytophthora* spp. pathogenic to citrus. Plant Disease Reporter, Vol. **43**, No. 7, 830-832
- KO, W.H. & CHAN, M.J. 1974. Infection and Colonization Potential of Sporangia, Zoospores, and Chlamydospores of *Phytophthora palmivora* in Soil. Phytopathology **64**, 1307-1309
- KOLB, A. 1986. Bewässerung verbreitet *Phytophthora*. Deutsche Baumschule **38** (10), 408-409
- KRÖBER, H. 1980. Überdauerung einiger *Phytophthora*-Arten im Boden. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz **87** (4), 227-235
- KRÖBER, H. 1985. Erfahrungen mit *Phytophthora* de Bary und *Pythium* Pringsheim. Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, Heft **225**, Blackwell Wissenschaftsverlag GmbH Berlin
- KÜHNE, H. 1979. *Phytophthora cinnamomi* - ein ernstzunehmender Schadpilz. Deutsche Baumschule **31** (11), 436-437
- KUIK VAN, A.J. 1992. Spread of *Phytophthora cinnamomi* Rands in a recycling system. Mededelingen-van-de-Faculteit-Landbouwetenschappen, Rijksuniversiteit-Gent **57/2a**, 139-143

- LUDWIG-OHM, S. 1996. Kostenkalkulation geschlossener Bewässerungssysteme im Zierpflanzenbau. I. Topfpflanzenanbau; II. Schnittblumenanbau. KTBL, Darmstadt. KTBL-Arbeitsblatt Gartenbau, 683-684
- LÜTTMANN, R. 1998. Pflanzen reinigen Rücklaufwasser – zu welchem Zweck? Deutsche Baumschule **3**, 7
- LUTZ, A.L. & MENGE, J.A. 1986. Breaking Winter Dormancy of *Phytophthora parasitica* Propagules Using Heat Shock. Mycologia **78** (1), 148-150
- LUTZ, A.L. & MENGE, J.A. 1991. Population Fluctuations and the Numbers of Propagules of *Phytophthora parasitica* That Occur in Irrigated Citrus Groves. Plant Disease **75**, 173-179
- LUTZ, A.L.; MENGE, J.A. & BENDER, G. 1988. Phytophthora root rot in Citrus: *Can it be controlled by Manipulation of Irrigation Practices?* California Grower, May, 8-10
- MACDONALD, J.D., STITES, J. & KABASHIMA, J. 1990. Comparison of serological and culture plate methods for detecting species of *Phytophthora*, *Pythium* and *Rhizoctonia* in ornamental plants. Plant Disease **74**, 655-659
- MACDONALD, J.D., ALI-SHTAYEH, M.S., STITES, J. & KABASHIMA, J. 1994. Occurrence of *Phytophthora* Species in Recirculated Nursery Irrigation Effluents. Plant Disease **78**, 607-611
- MAGNANO DI SAN LIO, G., MESSINA, F., GRECO, G. & PERROTTA, G. 1990. Effect of irrigation on the dynamics of *Phytophthora citrophthora* in soil of citrus orchards. Bulletin OEPP/ EPPO Bulletin **20**, 83-89
- MAN IN'T VELD, W.A., VEENBAAS-RIJKS, W.J., ILIEVA, E., DE COCK, A.W.A.M., BONANTS, P.J.M. & PIETERS, R. 1998. Natural Hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *Phytophthora cactorum* demonstrated by Isozyme Analysis and Random Amplified Polymorphic DNA. Phytopathology **88**, 922-929
- MARKS, G.C. & KASSABY, F.Y. 1972. Detection of *Phytophthora cinnamomi* in soils. Australian Forestry **36**, 198-203
- MCCAIN, A.H., HOLTZMAN, O.H. & TRUJILLO, E.E. 1967. Concentration of *Phytophthora cinnamomi* chlamydospores by soil sieving. Phytopathology **57**, 1134-1135
- MCINTOSH, D.L. 1966. The occurrence of *Phytophthora* spp. in irrigation systems in British Columbia. Canadian Journal of Botany **44**, 1591-1596
- MILLER, S.A., BHAT, R.G. & SCHMITTHENNER, A.F. 1994. Detection of *Phytophthora capsici* in pepper and cucurbit crops in Ohio with two commercial immunoassay kits. Plant Disease **78** (11), 1042-1046
- NIENHAUS, F. & KIEWNIK, L. 1998. Pflanzenschutz bei Ziergehölzen. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart (Germany), 460 Seiten
- OLD, K.M., OROS, J.M. & MALAFANT, K.W. 1984. Survival of *Phytophthora cinnamomi* in root fragments in Australian forest soils. Transactions of the British Mycological Society **82** (4), 605-613
- OLSSON, C.H.B. 1995. Diagnosis of *Phytophthora* infections in raspberry and strawberry plants by ELISA tests. Journal of Phytopathology **143**, 307-310

- OLSSON, C.H.B. 1999. Diagnosis of root-infecting *Phytophthora* spp. PhD Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, ISBN 91-576-5483-2
- OS VAN, E.A., RUNIA, W.T., BUUREN VAN, J. & MUNOZ-CARPENA, R. 1998. Prospects of slow sand filtration to eliminate pathogens from recirculating nutrient solution. *Acta Horticulturae* no. **458**, 377-382
- OSTROFSKY, W.D.; PRATT, R.G. & ROTH, L.F. 1977. Detection of *Phytophthora lateralis* in soil organic matter and factors that affect its survival. *Phytopathology* **67**, 79-84
- OUCHTERLONY, Ö. 1964. Gel-diffusion techniques. In: J.F. ACKROYD (ed.), *Immunological Methods*, Oxford, Blackwell Wissenschafts Verlag, 55-78
- OWNLEY, B.H. & BENSON, D.M. 1991. Relationship of Matric Water Potential and Air-filled Porosity of Container Media to Development of *Phytophthora* Root Rot of *Rhododendron*. *Phytopathology* **81**, 936-941
- PETTITT, T.R., FINLAY, A.R., SCOTT, M.A. & DAVIES, E.M. 1998. Development of a system simulating commercial production conditions for assessing the potential spread of *Phytophthora cryptogea* root rot of hardy nursery stock in recirculating irrigation water. *Annals of applied Biology* **132**, 61-75
- PITTIS, J.E. & COLHOUN, J. 1984. Isolation and identification of Pythiaceae fungi from irrigation water and their pathogenicity to *Antirrhinum*, tomato and *Chamaecyparis lawsoniana*. *Phytopathologische Zeitschrift* **110**, 301-318
- PRATT, B.H. & HEATHER, W.A. 1972. Method for rapid differentiation of *Phytophthora cinnamomi* from other *Phytophthora* species isolated from soil by lupin baiting. *Transactions of the British Mycological Society* **59** (1), 87-96
- PSCHIEDT, J.W., BURKET, J.Z., FISCHER, S.L. & HAMM, P.B. 1992. Sensitivity and clinical use of *Phytophthora*-specific immunoassay kits. *Plant Disease* **76**, 928-932
- RANGE, H. 1992. Gezielt entwässern – umweltschonend produzieren. *Gartenbau und Gartenwissenschaft* **25**, 1218-1219
- REUTER, C. 1996. Welches System wählen? In: *Blickpunkt Bewässerung*. ZVG Gartenbau-Report, 22. Jhg 9/96, 16-17
- RIBEIRO, O. K. 1978. A source book of the genus *Phytophthora*. A.-R. Gantner Verlag K.-G., FL-9490 Vaduz
- ROOS, B. & BEHRENDT, V. 1994. Bepflanzte Sandfilter. *Deutscher Gartenbau* **50**, 2998-3001
- RÜCKER, K. 1989. Freilandquartiere mit geschlossenem Wasserkreislauf. *Deutscher Gartenbau* **30**, 1826-1829
- RUNIA, W.T., MICHIELSEN, J.M.G.P., KUIK VAN, A.J. & OS VAN, E.A. 1997. Elimination of root-infection pathogens in recirculation water by slow sand filtration. *Proceedings of the 9th International Congress on Soilless Culture*. St. Helier, Jersey, Channel Islands, 12-19 April 1996, 395-407
- SEEMÜLLER, E. & SUN, C. 1989. Auftreten von Metalaxyl-Resistenz bei *Phytophthora fragariae*. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, **41** (5), 71-73, Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart.
- SEIPP, D. 1996. Der Gartenbau in Weser-Ems – seine Basis und Entwicklung. In: *Strukturen und Trends zwischen Weser und Ems*, TASPO Gartenbaumagazin **10/96**, 4-6

- SEITZ, P. 1995. Wasserrückhaltung in der Region. Deutscher Gartenbau **1**, 37-39
- SHEARER, C.A. & LANE, L.C. 1983. Comparison of three techniques for the study of aquatic hyphomycete communities. Mycologia **75** (3), 498-508
- SHEPHERD, C.J., & FORRESTER, R.I. 1977. Influence of isolation method on growth rate characteristics of populations of *Phytophthora cinnamomi*. Australasian Journal of Botany **25**, 477-482
- SHEW, H.D., BENSON, D.M., & GRAND, L.F. 1979. A comparison of baits for isolating *Phytophthora cinnamomi* from soil. (Abstr.) Phytopathology **69**, 532
- SHEW, H.D. & BENSON, D.M. 1982. Qualitative and quantitative soil assay for *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology **72**, 1029-1032
- SHOKES, F.M. & MCCARTER, S.M. 1979. Occurrence, dissemination and survival of plant pathogens in surface irrigation ponds in Southern Georgia. Phytopathology **69**, 510-516
- SOGIN-MITCHELL, L. & SILBERMAN, J.D. 1998. Evolution of the protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics. International Journal for Parasitology **28** (1), 11-20
- SOLEL, Z. & PINKAS, Y. 1984. A modified medium for detecting *Phytophthora cinnamomi* from Avocado roots. Phytopathology **84**, 506-508
- STAMPS, D.J., WATERHOUSE, G.M., NEWHOOK, F.J. & HALL, G.S. (ed.) 1990. Revised Key to the species of *Phytophthora*. C A B International Mycological Institute, Kew; Mycological Papers No. **162**
- STATISTISCHES BUNDESAMT 1998. Statistisches Jahrbuch über Ernährung, Landwirtschaft und Forsten der Bundesrepublik Deutschland. Landwirtschaftsverlag, Münster-Hiltrup
- STURM, A. 1990. Tropfbewässerungssysteme bei Baumschulcontainern. Deutscher Gartenbau **48**, 3080-3083
- SUTULA, C.L., GILLET, J.M., MORRISSEY, S.M. & RAMSDELL, D.C. 1986. Interpreting ELISA Data and Establishing the Positive-Negative Threshold. Plant Disease **70** (8), 722-726
- TAYLOR, P.A. 1977. *Phytophthora* spp. in irrigation water in the Goulburn Valley, Victoria. Australian Plant Pathology Society Newsletter **6**, 41-42
- THEMANN, K. & WERRES, S. 1998: Verwendung von Rhododendronblättern zum Nachweis von *Phytophthora*-Arten in Wurzel- und Bodenproben. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes, **50** (2), Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart, 37-45
- THINGGAARD, K. & MIDDELBOE, A.L. 1989. *Phytophthora* and *Pythium* in pot plant cultures grown on ebb and flow bench with recirculation nutrient solution. Journal of Phytopathology **125**, 343-352
- THOMSON, S.V. & ALLEN, R.M. 1974. Occurrence of *Phytophthora* species and other potential plant pathogens in recycled irrigation water. Plant Disease Reporter **58** (10), 945-949
- TIMMER, L.W., GRAHAM, J.H. & ZITKO, S.E. 1997. Metalaxyl-Resistant Isolates of *Phytophthora nicotianae*: Occurrence, Sensitivity, and Competitive Parasitic Ability on Citrus. Plant Disease **82**, 254-261

- TOPPE, B. & THINGGAARD, K. 1998. Prevention of Phytophthora Root Rot in *Gerbera* by increasing copper iron concentration in the nutrient solution. *European Journal of Plant Pathology* **104**, 359-366
- TSAO, P.H. 1960. A serial dilution end-point method for estimating disease potentials of citrus Phytophthoras in soil. *Phytopathology* **50**, 717-724
- TSAO, P.H. 1970. Selective media for isolation of pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* **8**, 157-186
- TSAO, P.H. 1990. Why many Phytophthora root rots and crown rots of tree and horticultural crops remain undetected. *Bulletin OEPP/ EPPO Bulletin* **20**, 11-17
- ULSAMER, P. 1996. Den richtigen Wasserspeicher wählen. In : Blickpunkt Bewässerung. ZVG Gartenbau-Report, 22. Jhg 9/96, 18-20
- VEGH, I., LEROUX, P., LE BERRE, A. & LANEN, C. 1985. Détection sur *Chamaecyparis lawsoniana* 'Ellwoodii' d' une souche de *Phytophthora cinnamomi* Rands résistante au phoséthyl-Al. P.H.M.-Revue horticole, n° 262, 19-21
- WATERHOUSE, G.M. 1963. Key to the species of Phytophthora De Bary. *Mycological Paper No. 92* Commonwealth Mycological Institute: Kew
- WERRES, S. 1987. Untersuchungen zur Rhizomfäule (*Phytophthora cactorum* [Leb. et Cohn] Schroet.) und zur Roten Wurzelfäule (*Phytophthora fragariae* Hickman) bei Erdbeerpflanzen und zum serologischen Nachweis von *Phytophthora fragariae* Dissertation Universität Hannover (Germany, F.R.)
- WERRES, S. & CASPER, R. 1987. Nachweis von *Phytophthora fragariae* Hickman in Wurzeln der Erdbeersorte 'Tenira' mit Hilfe des *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). *Journal of Phytopathology* **118** (4), 367-369
- WERRES, S. & THEMANN, K. 1993. Serologie in der Diagnostik phytopathogener Pilze - theoretische Grundlagen und Untersuchungen zur Standardisierung des *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem*, Bd. **289**, Verlag Paul Parey, Berlin, 46-59
- WERRES, S. & MARWITZ, R. 1997. Unbekannte *Phytophthora*. *Deutscher Gartenbau* **21**, 1166-1168
- WERRES, S., MARWITZ, R., MAN IN'T VELD, W.A., DE COCK, A.W.A.M., BONANTS, P.J.M., DE WEERDT, M., THEMANN, K., ILIEVA, E. & BAAYEN, R.P. 2001 (im Druck). *Phytophthora ramorum* sp. nov., a new pathogen on *Rhododendron* and *Viburnum*. *Mycological Research*
- WHITESIDE, J.O. & OSWALT, T.W. 1973. An unusual brown rot outbreak in a Florida citrus grove following sprinkler irrigation with *Phytophthora*-infested water. *Plant Disease Reporter* **57** (5), 391-393
- WIELAND, L. 1996. Containerkultur erfordert Umdenken. In: Strukturen und Trends zwischen Weser und Ems, *TASPO Gartenbaumagazin* **10/96**, 10-11
- WILSON, S.K., BROEMBSSEN VON, S.L. & ANDREWS, M.W. 1998. Pathogen management in capture and recyle irrigation systems for nurseries. *ASAE Annual International Meeting*, Orlando, Florida, USA, 12-16 July 1998, ASAE Paper no. 987004
- WITT, H.H. 1987. Wasserkollektoren. *TASPO Gartenbaumagazin* April, 6-10

- WITT, H.H. 1997. Containerkultur führte zu größeren Umwälzungen in den Baumschulen. TASPO Gartenbaumagazin Oktober, 38-40
- WOHANKA, W. 1990. Wasserentkeimung. In: MOLITOR, H.-D. et al. 1990. Geschlossene Kulturverfahren – Zierpflanzenbau. TASPO-Praxis **18**, Thalacker-Verlag Braunschweig, 73-81
- WOHANKA, W. 1993. Slow sand filtration and UV radiation; low cost techniques for disinfection of recirculating nutrient solution or surface water. ISOSC-Proceedings, 8th International Congress on Soilless Culture, 2.–9. October 1992, Southafrica, 497-511
- WOHANKA, W. 1999. Entkeimung von Nährlösung oder Gießwasser. TASPO Gartenbaumagazin September, Thalacker-Verlag Braunschweig, 55-60
- WOHANKA, W. & HELLE, M. 1997. Suitability of various filter media for slow filtration. Proceedings of the 9th International Congress on Soilless Culture, St. Helier, Jersey, 12-19 April 1996, 551-557
- ZENTMYER, G.A. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monograph No. **10**. The American Phytopathological Society, 3340 Pilot Knob Road, St. Paul, Minnesota 55121, 96
- ZENTMYER, G.A., GILPATRICK, J.D. & THORN, W.A. 1960. Methods of isolating *Phytophthora cinnamomi* from soil and from host tissue (Abstr.). Phytopathology **50**, 87

7 Anhang

Tabelle A1: Ergebnisse der Nährstoffuntersuchungen des Wassers während des gesamten Probenahmezeitraums (Daten LWK Weser-Ems) ¹⁾

a – aus den Teichen

Baum- schule	Termin	pH- Wert	Leitfähigkeit mg/l	NO ₃ -N mg/l	NH ₄ -N mg/l	K mg/l	Mg mg/l	P ₂ O ₅ mg/l
1	17.08.94	7,3	127	2,0	1,5	4,0	3,0	0,05
	24.10.94	5,1	118	1,5	1,5	6,0	3,0	0,08
	06.02.95	5,0	87	1,3	1,8	3,0	2,0	0,03
	27.03.95	4,6	86	2,1	0,9	2,0	3,0	0,03
	15.05.95	5,5	99	1,4	1,2	2,0	3,0	0,03
	11.07.95	6,6	104	0,0	1,9	1,0	3,0	0,03
	<i>Mittelwert</i>	<i>5.7</i>	<i>103</i>	<i>1.4</i>	<i>1.5</i>	<i>3.0</i>	<i>2.8</i>	<i>0.04</i>
2	17.08.94	7,1	247	4,0	1,5	8,0	8,0	0,09
	24.10.94	6,8	188	2,0	1,5	11,0	7,0	0,15
	06.02.95	6,9	184	1,0	1,0	4,0	7,0	0,14
	27.03.95	6,9	141	1,7	0,6	2,0	5,0	0,60
	15.05.95	7,2	317	6,9	4,3	7,0	10,0	0,60
	11.07.95	7,4	277	5,5	2,4	5,0	9,0	0,60
	<i>Mittelwert</i>	<i>7.0</i>	<i>226</i>	<i>3.5</i>	<i>1.9</i>	<i>6.2</i>	<i>7.7</i>	<i>0.36</i>
3 A	17.08.94	7,4	200	1,0	0,5	4,0	7,0	0,11
	24.10.94	7,1	158	0,5	0,5	6,0	5,0	0,08
	06.02.95	7,4	139	1,3	0,8	7,0	5,0	0,18
	27.03.95	7,7	153	0,4	0,2	4,0	5,0	0,03
	15.05.95	7,5	193	0,2	0,9	3,0	6,0	0,10
	11.07.95	7,9	201	2,7	0,6	7,0	8,0	0,92
	<i>Mittelwert</i>	<i>7.5</i>	<i>174</i>	<i>1.0</i>	<i>0.6</i>	<i>5.2</i>	<i>6.0</i>	<i>0.24</i>
3 B	24.10.94	7,6	186	0,5	0,5	5,0	6,0	0,03
4	17.08.94	6,6	71	0,5	1,5	2,0	1,0	0,14
	24.10.94	6,6	69	0,5	1,5	5,0	1,0	0,13
	06.02.95	6,4	61	1,8	1,0	3,0	2,0	0,55
	27.03.95	6,9	54	2,3	0,4	2,0	2,0	0,11
	15.05.95	6,9	72	0,4	3,4	1,0	1,0	0,03
	11.07.95	6,3	69	0,4	4,5	1,0	1,0	0,03
	<i>Mittelwert</i>	<i>6.6</i>	<i>66</i>	<i>0.9</i>	<i>2.0</i>	<i>2.3</i>	<i>1.3</i>	<i>0.16</i>

b – aus den Brunnen

Baum- schule	Termin	pH- Wert	Leitfähigkeit mg/l	NO ₃ -N mg/l	NH ₄ -N mg/l	K mg/l	Mg mg/l	P ₂ O ₅ mg/l
1	24.10.94	5,4	96	0,5	1,0	4,0	2,0	0,05
	15.05.95	5,5	114	0,2	1,2	1,0	3,0	0,10
	11.07.95	5,3	96	0,2	1,5	1,0	3,0	0,07
2	24.10.94	7,2	218	0,5	0,5	4,0	7,0	0,03
	15.05.95	6,9	258	0,2	0,5	1,0	8,0	0,64
	11.07.95	7,1	248	0,4	0,2	1,0	8,0	0,07
3	24.10.94	6,9	199	0,5	0,5	5,0	7,0	0,06
	15.05.95	6,9	224	0,2	0,3	1,0	7,0	0,32
	11.07.95	7,2	197	0,5	0,4	1,0	7,0	0,32
4	24.10.94	5,7	86	0,5	2,0	5,0	1,0	0,11
	15.05.95	6,1	106	0,2	4,6	2,0	2,0	0,14
	11.07.95	6,0	80	0,5	5,1	1,0	2,0	0,14

¹⁾ Landwirtschaftskammer Weser-Ems, Mars-la-Tour-Str. 1-13, Abteilung Gartenbau, D-26121 Oldenburg; Bestimmung nach VDLUFA-Methodenbuch Band I, Kap. A, vierte Auflage (LUFA = Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt der Landwirtschaftskammer Weser-Ems, Jägerstr. 23-27, D-26121 Oldenburg); Neubearbeitet von Prof. Dr. G. Hoffmann, 1. Teillieferung 1991, VDLUFA-Verlag – Darmstadt: 1-21.

NO₃-N = Nitratstickstoff, NH₄-N = Ammoniumstickstoff, K = Kalium, Mg = Magnesium, P₂O₅ = Phosphat

Tabelle A2: Nachgewiesene Pflanzenschutzmittelrückstände in Teichwasser und -sediment 1994 und 1995 - Daten LWK Weser-Ems ¹⁾

Baumschule, Art der Probe	Termin	Pflanzenschutzmittel Handelsname (Wirkstoff)	Konzentration
1 Wasser	17.08.94	Fungizid Desmel (Propiconazol)	0,1 µg / l
2 Sediment	17.08.94	Insektizid Apollo (Chlofentezin)	0,18 mg / kg
		Molluskizid Mesurol (Methiocarb)	0,08 mg / kg
		Fungizid Euparen (Dichlofluanid)	0,22 mg / kg
		Herbizid Karmex (Diuron)	0,78 mg / kg
		Schwefelkohlenstoff (Mancozeb; Propineb)	10,1 mg / kg
	24.10.94	Insektizid Apollo (Chlofentezin)	0,11 mg / kg
		Fungizid Euparen (Dichlofluanid)	0,11 mg / kg
		Herbizid Karmex (Diuron)	0,49 mg / kg
		Schwefelkohlenstoff (Mancozeb; Propineb)	6,8 mg / kg
3A Sediment	17.08.94	Insektizid Amitraz (Mitac)	0,08 mg / kg
		Herbizid Tenoran (Chloroxuron)	0,82 mg / kg
	24.10.94	Herbizid Tenoran (Chloroxuron)	0,51 mg / kg
4 Wasser	17.08.94	Fungizid Saproil (Triforin)	0,4 µg / l
		Herbizid Karmex (Diuron)	0,2 µg / l

Fortsetzung **Tabelle A2**

Baumschule, Art der Probe	Termin	Pflanzenschutzmittel Handelsname (Wirkstoff)	Konzentration
4 Sediment	17.08.94	Insektizid Apollo (Chlofentezin)	0,21 mg / kg
		Fungizid Sapro (Triforin)	0,08 mg / kg
		Herbizid Karmex (Diuron)	0,45 mg / kg
	24.10.94	Insektizid Apollo (Chlofentezin)	0,14 mg / kg
		Herbizid Karmex (Diuron)	0,34 mg / kg

¹⁾ Landwirtschaftskammer Weser-Ems, Mars-la-Tour-Str. 1-13, Abteilung Gartenbau, D-26121 Oldenburg; Analysendurchführung LUFA (Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt der Landwirtschaftskammer Weser-Ems, Jägerstr. 23-27, D-26121 Oldenburg);
Nur Werte von > 0,1 µg / l, bzw. > 0,05 mg / kg. Diese Grenze entspricht dem zulässigen Höchstwert eines Einzelwirkstoffs im Trinkwasser für den menschlichen Gebrauch in der Europäischen Union. Aufgeführt sind die Termine, zu denen parallel Untersuchungen auf *Phytophthora* spp. durchgeführt wurden.
1994 wurden die Proben auf Rückstände derjenigen Pflanzenschutzmittel hin untersucht, die nach Angaben der einzelnen Betriebe im Laufe des Jahres eingesetzt worden waren. 1995 wurden die Proben nur auf Rückstände oomycetenspezifischer Fungizide untersucht.

Tabelle Aa2: Wirkstoffe, auf deren Rückstände Teichwasser und -sedimente 1994 und 1995 untersucht wurden - Daten LWK Weser-Ems

Baumschule, Art der Probe	Termin	Wirkstoff (Pflanzenschutzmittel Handelsname)
1 Wasser	17.08.94	Chlofentezin (Apollo); Oxidemetonmethyl (Metasystox); Amitraz (Mitac); Methamidophos (Tamaron); Fosethyl-Al (Aliette); Bitertanol (Baymat); Dichlofluanid (Euparen); Triforin (Sapro); Prochloraz (Sportak); Chloroxuron (Tenoran); Lenacil (Venzar); Schwefelkohlenstoff (Mancozeb, Metiram)
	24.10.94	
	06.02.95	Fosethyl-Al; Metalaxyl; Propamocarb; Dimethomorph; Schwefelkohlenstoff
	15.05.95	
2 Wasser, Sediment	17.08.94	Binapacryl (Acricid conc.); Imidachlopid (Confidor); Cypermethrin (Cymbush); Parathionethyl (E 605 forte); Heptenophos (Hostaquick); Lambdacyhalothrin (Karate); Amitraz (Mitac); Thionazin (Nemafos); Dimethoat (Roxion); Methamidophos (Tamaron); Fosethyl-Al (Aliette); Triadimenol (Bayfidan); Bitertanol (Baymat); Captan (Captan); Bupirimat (Nimrod); Metalaxyl (Ridomil TK); Triforin (Sapro); Fluazinam (Shirlan); Prochloraz (Sportak); Linuron (Afon); Chlortoluron (Dicuran); Glyphosat (Round up); Simazin (Simazin); Hexazinon (Velpar); Fosethyl-Al; Metalaxyl; Propamocarb; Dimethomorph; Schwefelkohlenstoff
	24.10.94	
	06.02.95	Fosethyl-Al; Metalaxyl; Propamocarb; Dimethomorph; Schwefelkohlenstoff
	15.05.95	
3A Wasser, Sediment	17.08.94	Chlofentezin (Apollo); Parathionethyl (Parathion); Oxidemetonmethyl (Metasystox); Methamidophos (Tamaron); Bitertanol (Baymat, Baycur); Baythroid (Cyfluthrin); Diflubenzuron (Dimilin 25 WP); Cypermethrin (Ripcord 40); Propoxur (Uden); Lindan (Harvesan plus); Iprodion (Rovral); Triforin (Sapro Neu); Prochloraz (Sportak); Thiophanatemethyl (Topsin M); Propyzamid (Kerb 50); Lenacil (Venzar); Schwefelkohlenstoff (Mancozeb, Metiram)
	24.10.94	
	06.02.95	Fosethyl-Al; Metalaxyl; Propamocarb; Dimethomorph; Schwefelkohlenstoff
	15.05.95	
4 Wasser, Sediment	17.08.94	Parathionethyl (E 605, Folidolöl); Oxidemetonmethyl (Metasystox); Methamidophos (Tamaron); Bitertanol (Baymat); Dichlofluanid (Euparen); Propamocarb (Previcur N); Thiophanatemethyl (Topsin M); Propyzamid (Kerb 50); Chloroxuron (Tenoran); Lenacil (Venzar); Schwefelkohlenstoff (Mancozeb, Metiram)
	24.10.94	
	06.02.95	Fosethyl-Al; Metalaxyl; Propamocarb; Dimethomorph; Schwefelkohlenstoff
	15.05.95	

Tabelle A3: Gesamtergebnisse zum Nachweis von *Phytophthora* spp. mit den Testverfahren (Symbol: x = Nachweis, o = kein Nachweis, - = keine Probenahme)

Probenahmeort ¹⁾		Nachweis von <i>Phytophthora</i> spp. zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt ²⁾ mit																																				
		Mikrobiolog. Methoden				Apfel		Lupinensämlinge				Rhododendronblatt		<i>P. cactorum</i>				<i>P. cinnamomi</i>																				
		A	O	N	F	M	M	J	A	O	N	F	M	M	J	A	O	N	F	M	M	J	A	O	N	F	M	M	J									
Brunnen	1 BW	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	
Brunnen	2 BW	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	
Brunnen	3 BW	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	
Brunnen	4 BW	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o	
Ablauf	1a AW	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
Ablauf	1b AW	o	o	o	-	o	o	o	o	o	-	o	o	o	o	o	-	o	o	o	o	o	-	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
Ablauf	2a AS	o	x	o	o	x	o	o	x	o	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Ablauf	2b AS	-	o	x	o	o	x	-	o	o	o	o	x	-	x	x	x	x	x	x	x	-	o	o	x	o	o	-	x	x	x	x	x	x	x	o	o	
Ablauf	3a AS	o	x	x	o	o	x	o	o	x	o	x	x	o	o	x	x	x	x	x	x	o	o	x	o	o	o	o	o	x	x	x	x	x	x	o	o	
Ablauf	3b AS	o	o	x	o	o	o	o	o	x	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
Ablauf	3c AS	o	x	x	x	o	o	o	x	o	o	o	x	o	o	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o	x	
Ablauf	4 AS	-	o	o	o	o	x	-	o	o	o	o	o	-	x	x	x	x	x	o	-	o	o	o	o	o	-	o	x	o	o	x	o	o	x	o		
Teich	1 TW	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
Teich	2 TW	o	o	o	o	o	o	o	x	o	o	o	o	o	o	x	x	x	o	x	o	o	x	o	o	o	o	x	x	o	x	o	o	o	o	o		
Teich	2 TS	o	o	x	x	o	o	o	x	o	o	o	o	o	x	o	o	x	o	o	o	o	o	o	o	o	o	x	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
Teich	3a TW	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	x	o	o	x	o	o	o	o	o	o	o	o	o	x	o	o	o	o	o	o	o	o		
Teich	3a TS	o	o	x	o	x	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	x	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	x	o		
Teich	3b TW	-	o	x	o	o	o	-	o	o	x	o	o	-	o	o	x	o	o	-	o	o	o	o	o	o	-	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
Teich	3b TS	-	o	o	o	o	o	-	o	o	o	o	o	-	o	o	o	o	o	-	o	o	o	o	o	o	-	o	o	o	o	o	o	o	o	x	o	
Teich	4 TW	-	o	o	o	o	o	-	o	o	o	o	x	-	o	x	x	o	o	-	o	x	o	o	o	o	-	x	x	x	o	o	o	o	x	o	o	
Teich	4 TS	-	o	x	x	o	x	-	o	x	x	x	o	-	x	x	x	x	x	-	o	o	x	o	o	-	o	o	o	o	o	o	o	o	x	o	x	o

¹⁾ Abk. siehe 2.4.3, Tab. 6

²⁾ A = 29.08.94; O = 24.10.94; N = 28.11.94; F = 06.02.95; M = 27.03.95; M = 15.05.95; J = 11.07.95

Tabelle A4: Extinktionswerte im DAS-ELISA ($E_{405\text{ nm}}$) zu den Probenahmetermeninen ¹⁾ (Mittelwerte aus drei Testungen nach Abzug des Blind (Puffer) -Wertes)

Probenahmeort ²⁾	DAS-ELISA, Antiserum gegen												
	<i>P. cactorum</i> 9/8892						<i>P. cinnamomi</i> 8/88/92						
	A	O	N	F	M	J	A	O	N	F	M	J	
Brunnen 1 BW	-	0,032	0,025	-	-	0,001	0,047	-	0,065	0,006	-	0,001	0,053
Brunnen 2 BW	-	0,001	0,014	-	-	0,018	0,005	-	0,134	0,054	-	0,030	0,009
Brunnen 3 BW	-	0,005	0,070	-	-	0,023	0,023	-	0,012	0,057	-	0,053	0,063
Brunnen 4 BW	-	0,084	0,012	-	-	0,028	0,008	-	0,045	0,021	-	0,071	0,014
Ablauf 1a AW	0,001	0,005	0,106	0,190	0,080	0,039	0,016	0,065	0,233	0,103	0,211	0,163	0,035
Ablauf 1b AW	0,006	0,073	0,065	-	0,026	0,045	0,043	0,076	0,143	0,058	-	0,057	0,092
Ablauf 2a AS	0,011	0,061	0,098	0,382	0,281	0,084	0,027	0,039	0,169	0,309	0,363	0,563	0,057
Ablauf 2b AS	-	0,098	0,054	0,186	0,125	0,069	0,056	-	0,175	0,186	0,214	0,212	0,087
Ablauf 3a AS	0,000	0,039	0,083	0,379	0,021	0,061	0,006	0,037	0,071	0,183	0,251	0,068	0,135
Ablauf 3b AS	0,014	0,061	0,021	0,056	0,101	0,158	0,028	0,066	0,086	0,080	0,068	0,224	0,141
Ablauf 3c AS	0,208	0,459	0,287	0,137	0,090	0,049	0,084	0,380	0,544	0,551	0,140	0,164	0,115
Ablauf 4 AS	-	0,042	0,031	0,109	0,042	0,087	0,006	-	0,112	0,151	0,125	0,120	0,179
Teich 1 TW	0,009	0,104	0,089	0,061	0,102	0,029	0,01	0,077	0,290	0,058	0,074	0,201	0,058
Teich 2 TW	0,002	0,042	0,210	0,258	0,067	0,013	0,047	0,042	0,189	0,189	0,219	0,130	0,023
Teich 2 TS	0,002	0,102	0,016	0,141	0,034	0,028	0,015	0,048	0,186	0,072	0,140	0,085	0,108
Teich 3a TW	0,005	0,013	0,036	0,028	0,089	0,031	0,021	0,017	0,180	0,039	0,058	0,153	0,069
Teich 3a TS	0,002	0,057	0,023	0,144	0,084	0,024	0,018	0,046	0,128	0,095	0,154	0,272	0,076
Teich 3b TW	-	0,085	0,008	0,040	0,066	0,007	0,003	-	0,120	0,032	0,048	0,135	0,020
Teich 3b TS	-	0,031	0,005	0,108	0,021	0,117	0,017	-	0,081	0,038	0,111	0,061	0,231
Teich 4 TW	-	0,025	0,187	0,247	0,108	0,017	0,029	-	0,163	0,230	0,244	0,199	0,038
Teich 4 TS	-	0,014	0,025	0,264	0,122	0,104	0,017	-	0,049	0,082	0,234	0,265	0,208

¹⁾ A = 29.08.94; O = 24.10.94; N = 28.11.94; F = 06.02.95; M = 27.03.95; J = 15.05.95; M = 15.05.95; J = 11.07.95; - = keine Probenahme

²⁾ Abk. siehe 2.4.3, Tab. 6

Tabelle A5: Temperatur- und Niederschlagsdaten Friesoythe/Edewechterdamm (Deutscher Wetterdienst ISSN 0435-7965, Monatlicher Witterungsbericht)

Monat/Jahr	Durchschnitts- temp. (° C)	Abweichung vom Mittel (° C; 1951-80)	Zahl heißer Tage	Zahl Sommertage	Zahl Frosttage	Nieder- schlagshöhe (mm)	In % vom Mittel (1951-80)
August 94	17,4	+ 1,2	2	7	0	78	91
September 94	13,2	- 0,2	0	0	0	134	223
Oktober 94	8,2	- 1,2	0	0	2	75	117
November 94	8,1	+ 3,0	0	0	2	41	57
Dezember 94	4,7	+ 2,4	0	0	10	80	105
Januar 95	2,2	+ 1,2	0	0	11	126	166
Februar 95	5,4	+ 4,0	0	0	5	108	212
März 95	4,0	- 0,1	0	0	10	88	142
April 95	8,1	+ 1,1	0	0	1	31	53
Mai 95	12,0	- 0,3	0	3	0	48	71
Juni 95	14,6	- 0,7	0	6	0	86	113
Juli 95	19,9	+ 3,3	3	20	0	90	110

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. H.J. Aust möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich für die Überlassung des Themas, die gewährte Unterstützung, das Interesse am Fortgang der Arbeit und den bei den Untersuchungen gewährten Freiraum bedanken. Frau Prof. Dr. R. König danke ich ebenfalls ganz herzlich für die Übernahme des Korreferates und das Interesse an dieser Arbeit.

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Pflanzenschutz im Gartenbau der Biologischen Bundesanstalt (BBA) in Braunschweig durchgeführt. Dem Institutsleiter Herrn Dr. G.F. Backhaus bin ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes zu Dank verpflichtet. Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern, die mit einer angenehmen Arbeitsatmosphäre und stets vorhandener Diskussionsbereitschaft zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. S. Werres, die das Projekt initiiert hat. Sie hat mich fortwährend durch diese Arbeit hindurch begleitet, motiviert und unterstützt. Danken möchte ich ihr besonders für die wissenschaftliche Betreuung, ihre ständige Diskussionsbereitschaft, ihre vielen Ideen und vor allem ihre unermüdliche Energie.

Die Untersuchungen in den Baumschulen wurden in Zusammenarbeit mit der Landwirtschaftskammer Weser-Ems in Oldenburg durchgeführt. Mein herzlicher Dank gilt dem dortigen Leiter der Gartenbauabteilung Dr. D. Seipp für die unkomplizierte Kooperation während dieser Zeit und das mir zur Verfügung gestellte Datenmaterial der Nährstoff- und Rückstandsuntersuchungen. Bei dem dortigen Mitarbeiter Herrn Dipl.-Ing. R. Lüttmann möchte ich mich vor allem für die vielen wertvollen Praxisinformationen zum Thema Baumschule und die tatkräftige Unterstützung bei den Probenahmen bedanken.

Den Betriebsleitern der beprobten Baumschulen im Ammerland möchte ich für Ihre bereitwillige Zusammenarbeit und die vielen Auskünfte herzlich danken. Ohne ihre Zustimmung hätten die Untersuchungen nicht durchgeführt werden können.

Danke sage ich auch allen technischen Assistentinnen und Gärtnern des Instituts G für ihre zuverlässige Hilfe und Assistenz bei den Untersuchungen - besonders Frau S. Barnstorf, Frau P. Pott, Frau P. Kumlehn und Frau H. Westphal.

Die vorliegende Arbeit wurde zum Teil durch Mittel des Landes Niedersachsen finanziert, auch hierfür ein Dankeschön.

Nicht vergessen möchte ich meine liebe Familie, allen voran mein Mann Dipl.-Ing. Stefan Marke und meine Eltern Maria und Otto Themann, denen ich für ihr Vertrauen, ihre Geduld und moralische Unterstützung während dieser Jahre ganz herzlich danke. Dankbar bin ich auch meinem Großvater Herrn Josef Themann, der, solange es ihm noch möglich war, mich auf meinem Weg immer wohlwollend und aufmerksam begleitet hat.